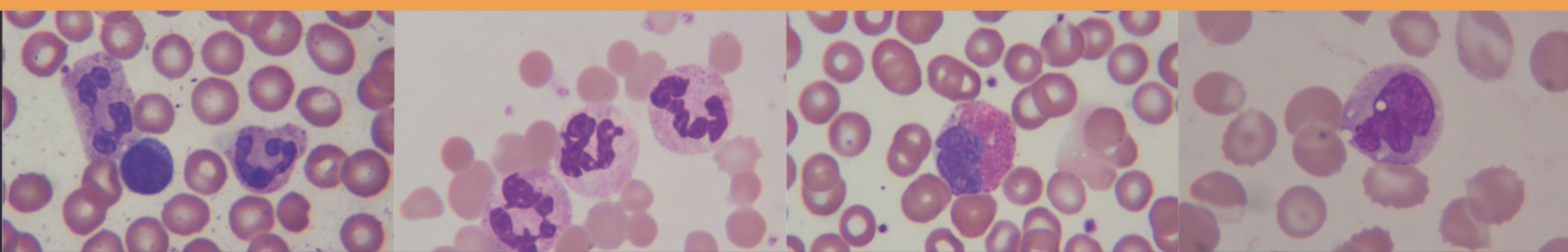




# HEMATOLOGIA LABORATORIAL

TEORIA E PROCEDIMENTOS



PAULO HENRIQUE DA SILVA • HEMERSON BERTASSONI ALVES

SAMUEL RICARDO COMAR • RAILSON HENNEBERG

JÚLIO CEZAR MERLIN • SÉRVIO TÚLIO STINGHEN



### Nota

A hematologia está em constante evolução. À medida que novas pesquisas e a própria experiência ampliam o nosso conhecimento, novas descobertas são realizadas. Os autores desta obra consultaram as fontes consideradas confiáveis, num esforço para oferecer informações completas e, geralmente, de acordo com os padrões aceitos à época da sua publicação.



---

H487      Hematologia laboratorial : teoria e procedimentos [recurso eletrônico] / Paulo Henrique da Silva ... [et al.]. – Porto Alegre : Artmed, 2016.

Editado como livro impresso em 2016.  
ISBN 978-85-8271-260-3

1. Farmácia. 2. Hematologia. I. Silva, Paulo Henrique.

CDU 615.12

---

Catálogo na publicação: Poliana Sanchez de Araujo – CRB 10/2094



**PAULO HENRIQUE DA SILVA**  
**HEMERSON BERTASSONI ALVES**  
**SAMUEL RICARDO COMAR**  
**RAILSON HENNEBERG**  
**JÚLIO CEZAR MERLIN**  
**SÉRVIO TÚLIO STINGHEN**

# **HEMATOLOGIA** **LABORATORIAL**

**TEORIA E PROCEDIMENTOS**

Versão impressa  
desta obra: 2016



2016



© Artmed Editora S.A., 2016.

Gerente editorial: *Letícia Bispo de Lima*

**Colaboraram nesta edição:**

Editora: *Mirian Raquel Fachinetto Cunha*

Capa: *Márcio Monticelli*

Ilustrações: *Gilnei da Costa Cunha*

Preparação de originais: *Daniela Ribeiro Costa, Alda Rejane Barcelos Hansen, Carine Prates*

Leitura final: *Samanta Sá Canfield*

Editoração: *Know-how Editorial*

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à  
ARTMED EDITORA LTDA., uma empresa do GRUPO A EDUCAÇÃO S.A.  
Av. Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana  
90040-340 – Porto Alegre – RS  
Fone: (51) 3027-7000 Fax: (51) 3027-7070

Unidade São Paulo  
Av. Embaixador Macedo Soares, 10.735 – Pavilhão 5 – Cond. Espace Center  
Vila Anastácio – 05095-035 – São Paulo – SP  
Fone: (11) 3665-1100 Fax: (11) 3667-1333

SAC 0800 703-3444 – [www.grupoa.com.br](http://www.grupoa.com.br)

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte,  
sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia,  
distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

IMPRESSO NO BRASIL  
PRINTED IN BRAZIL



## AUTORES



**Paulo Henrique da Silva** Farmacêutico-bioquímico. Professor de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestre em Genética pela UFPR. Doutor em Biologia Celular e Molecular pela UFPR.

**Hemerson Bertassoni Alves** Farmacêutico-bioquímico. Perito criminal do Estado do Paraná. Diretor geral da Polícia Científica do Paraná. Professor de Hematologia da Faculdade Educacional Araucária (Facear-PR). Especialista em Imunologia pela UFPR. Mestre em Análises Clínicas: Biologia Molecular pela Universidade de São Paulo (USP). Doutor em Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

**Samuel Ricardo Comar** Farmacêutico-bioquímico. Preceptor da Residência Multiprofissional em Atenção Hospitalar: Hematologia/Oncologia do Hospital de Clínicas da UFPR. Atua no Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR e no Setor de Hematologia do Laboratório Municipal de Araucária/PR. Especialista em Hematologia Laboratorial pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFPR. Doutor em Medicina Interna pela UFPR.

**Railson Henneberg** Farmacêutico-bioquímico. Chefe do Departamento de Análises Clínicas e Diretor do Laboratório Clínico Escola da UFPR. Professor adjunto das disciplinas de Estágio em Análises Clínicas do Curso de Farmácia da UFPR. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho de Araraquara (UNESP). Doutor em Ciências Farmacêuticas pela UFPR.

**Júlio Cezar Merlin** Farmacêutico-bioquímico. Professor de Hematologia, Citopatologia e Patologia da Escola de Saúde e Biociências da PUCPR. Professor da disciplina de Métodos Diagnósticos Complementares I (Medicina Laboratorial) – Internato de Clínica Médica – e professor tutor (PBL) da Escola de Medicina da PUCPR. Especialista em Hematologia e Citopatologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Mestre em Biologia Celular, Molecular e Morfologia pela UFPR. Doutorando em Ciências da Saúde da PUCPR.

**Sérvio Túlio Stingen** Farmacêutico-bioquímico. Diretor do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). Professor de Pós-graduação em Imunologia e Imuno-hematologia. Especialista em Imunologia pela UFPR e em Gestão da Aprendizagem pela Universidade Positivo. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFPR. Doutor em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas pela UFPR.



**Esta página foi deixada em branco intencionalmente**



## APRESENTAÇÃO



Fui honrado com o convite dos autores para apresentar *Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos*. Como toda obra coletiva, esta precisa ser analisada levando-se em consideração a riqueza específica de cada contribuição, a diversidade e o foco que apresenta, o propósito e o “espírito” que se extrai de sua leitura.

Agradeço a todos, de coração, pelo privilégio! Apresentar este livro representa para mim uma alegria e uma responsabilidade ímpar.

*Alegria* porque tive o privilégio de participar e assistir a sua gênese. O seu início remete aos dez anos em que, juntamente com o professor Paulo Henrique da Silva, ministramos o Curso de Interpretação Laboratorial do Hemograma (curso teórico-prático) e participamos de cursos de graduação e pós-graduação, de simpósios, congressos e de cursos de capacitação em que frequentaram profissionais farmacêuticos-bioquímicos, veterinários, biomédicos e médicos. Dessa parceria e experiência resultaram quatro livros. Em 2009, com a participação do professor Hemerson Bertassoni Alves, publicamos um novo livro sobre hematologia laboratorial. *Responsabilidade ímpar* porque, mesmo conhecendo os autores – ou como ex-alunos da graduação e/ou da pós-graduação ou compartilhando atividades didáticas em inúmeros eventos –, mantenho-me com a independência crítica necessária para avaliação da obra.

Os autores são professores, amigos e profissionais renomados que vivenciam ou conviveram com a rotina de um laboratório clínico, apresentando, por isso, tanto a ciência básica da hematologia quanto a prática laboratorial. Escrita a “6 mãos”, é dedicada aos profissionais que buscam um aprendizado relacionado a situações reais. Para tanto, é extremamente oportuna a inclusão do capítulo sobre imuno-hematologia eritrocitária, que enriquece e amplia conhecimento da área.

**Aplicação e utilidade** são a base dos 14 capítulos aqui reunidos, todos estruturados didaticamente, desde os dedicados às fases analíticas, eritrograma e leucograma como aqueles sobre neoplasias hematológicas, hemostasia ou imuno-hematologia. Por sua **utilidade**, esta obra terá lugar de destaque tanto para estudantes de graduação e pós-graduação como para aqueles profissionais com envolvimento diário na prática da hematologia laboratorial.

Parabéns aos autores! Fico com a certeza de que o grupo irá publicar outras edições – ainda melhores –, sempre atualizadas, sem perder o foco e com o mesmo objetivo desta: ser útil a profissionais “analistas clínicos”, para que sua atuação profissional seja plena e com o mais alto grau de responsabilidade.

**Yoshio Hashimoto**

Professor de Hematologia  
Curso de Farmácia e Bioquímica  
Departamento de Patologia Médica  
Setor de Ciências da Saúde  
Universidade Federal do Paraná



**Esta página foi deixada em branco intencionalmente**



## PREFÁCIO



Reunidos em um grupo de seis pessoas, todas com trajetória profissional voltada à bancada do Laboratório de Análises Clínicas e à Academia, produzimos este livro que contempla todas as áreas da hematologia, além de trazer um capítulo sobre imuno-hematologia voltado para o laboratório de análises clínicas. Durante o período em que nos dedicamos a escrever o livro, muitas reuniões foram necessárias para discutirmos o andamento e a estrutura de todos os capítulos. Estas reuniões foram muito prazerosas pela alegria do encontro e pelos conhecimentos trocados que resultaram na forma final de *Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos* – um livro voltado ao profissional que, no seu dia a dia, trabalha no laboratório de análises clínicas, mas que também pode ser usado como fonte de consulta e aprendizado pelos demais profissionais da área de saúde que se interessam pela hematologia.

**Os autores**



**Esta página foi deixada em branco intencionalmente**



# SUMÁRIO



Apresentação .....	VII
<i>Yoshio Hashimoto</i>	
1. Fase pré-analítica em hematologia laboratorial.....	1
2. Fase analítica: analisadores hematológicos e novos parâmetros derivados da automação .....	17
3. Fase analítica: análise morfológica do sangue periférico e sua correlação com o hemograma .....	41
4. Qualidade em hematologia.....	71
5. Série vermelha – eritrograma: eritropoiese e metabolismo energético do eritrócito ....	93
6. Série vermelha – eritrograma: avaliação laboratorial e classificação das anemias ...	109
7. Série vermelha – eritrograma: classificação morfofisiológica das anemias .....	135
8. Série branca – leucograma: aspectos gerais.....	205
9. Série branca – leucograma: processos infecciosos bacterianos, inflamatórios e infecção por protozoários .....	235
10. Série branca – leucograma: processos infecciosos virais e anomalias leucocitárias.....	255
11. Neoplasias hematológicas: leucemias e linfomas.....	263
12. Fase pós-analítica: aspectos gerais da hemostasia e hemostasia primária.....	317
13. Fase pós-analítica: hemostasia secundária .....	345
14. Imuno-hematologia eritrocitária .....	391
Índice.....	429



**Esta página foi deixada em branco intencionalmente**



# FASE PRÉ-ANALÍTICA EM HEMATOLOGIA LABORATORIAL

1



O processamento das amostras para exames laboratoriais é composto por três fases denominadas de pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica engloba todas as atividades que precedem o ensaio laboratorial, ou seja, compreende as atividades realizadas antes da determinação analítica. A fase analítica inicia-se com a validação do sistema analítico, passando pelo controle de qualidade interno e se encerra quando a determinação analítica gera um resultado. Já a fase pós-analítica inicia-se após a geração do resultado analítico, quantitativo e/ou qualitativo, sendo finalizada após a entrega do laudo e interpretação do resultado.<sup>1</sup>

Conforme o **Quadro 1.1**, cada etapa possui fontes de erros que afetam a qualidade e confiabilidade dos resultados reportados. Com o uso de equipamentos automatizados no laboratório de hematologia, o processo analítico e seu controle se tornaram mais confiáveis. Contudo, erros ainda ocorrem e são, na maioria dos casos, observados durante as fases pré e pós-analítica, as quais são conjuntamente chamadas de fase extra-analítica. Portanto, conhecer os fatores que influenciam a qualidade dos resultados, desde o preparo do paciente para a coleta da amostra, passando pela análise propriamente dita, até a emissão dos resultados, é de fundamental importância para que sejam estabelecidas estratégias e ferramentas de monitoramento dos processos envolvidos, de modo que funcionem como planejado e especificado.

A fase pré-analítica envolve todos os fatores que devem ser levados em conta antes da realização do exame propriamente dito e que exerçam influência direta na interpretação dos resultados. Ela necessita de procedimentos que indiquem e controlem suas possíveis falhas, de modo a permitir que as inferências dos estudos de precisão e exatidão dos sistemas analíticos realmente contribuam para melhorias das fases analítica e pós-analítica. As fontes de variação pré-analítica podem ser divididas em variáveis fisiológicas, variáveis de coleta e manipulação da amostra e variáveis endógenas, que são mostradas, de modo didático, no **Quadro 1.2**. Cabe lembrar que tudo começa com a solicitação dos exames mais apropriados, no momento certo, os quais serão interpretados corretamente, o que traz benefícios aos pacientes, aos médicos e aos laboratórios.

## VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS

Determinados fatores fisiológicos, intrínsecos ao paciente, podem afetar os resultados dos exames laboratoriais. Estes fatores incluem situação clínica do paciente, idade, sexo e raça, jejum, postura, efeitos do exercício físico, ritmo circadiano, altitude em que foram coletados os exames, gravidez e estilo de vida do indivíduo.

## ■ SITUAÇÃO CLÍNICA

A situação clínica do paciente se refere ao porquê ele está realizando o exame solicitado. Isso pode parecer uma situação irrelevante, mas na hematologia pode



QUADRO 1.1 Fontes e frequências de erro que afetam a qualidade e confiabilidade dos resultados		
FASE PRÉ-ANALÍTICA 46-68%	FASE ANALÍTICA 7-13%	FASE PÓS-ANALÍTICA 19-47%
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Orientação inadequada ao paciente</li><li>▪ Tempo de jejum</li><li>▪ Legibilidade da requisição médica</li><li>▪ Requisição médica incorreta</li><li>▪ Interpretação incorreta da requisição médica</li><li>▪ Perda da requisição médica</li><li>▪ Coleta inadequada</li><li>▪ Estase venosa prolongada</li><li>▪ Utilização de tubo de coleta inadequado</li><li>▪ Incorreta proporção entre sangue e anticoagulante</li><li>▪ Identificação incorreta do paciente</li><li>▪ Transporte e armazenamento da amostra inadequados</li><li>▪ Centrifugação inadequada</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Falha no equipamento</li><li>▪ Perda da amostra</li><li>▪ Troca da amostra</li><li>▪ Contaminação entre amostras</li><li>▪ Sistema analítico não validado previamente à análise</li><li>▪ Falhas não detectadas no controle interno de qualidade: erro sistemático e erro randômico</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perda do resultado</li><li>▪ Interpretação equivocada do resultado e ação subsequente</li><li>▪ Erro na transcrição dos resultados</li><li>▪ Tempo de liberação dos resultados acima do especificado</li><li>▪ Problemas com o sistema de informação laboratorial</li><li>▪ Valores de referência e limites de decisão inapropriados</li></ul>

Fonte: Adaptada de Lima-Oliveira e colaboradores<sup>2</sup> e Plebani.<sup>3</sup>

QUADRO 1.2 Fontes de variação pré-analítica		
VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS	VARIÁVEIS DE COLETA E MANIPULAÇÃO DA AMOSTRA	VARIÁVEIS ENDÓGENAS
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Situação clínica</li><li>▪ Idade</li><li>▪ Sexo</li><li>▪ Raça</li><li>▪ Jejum</li><li>▪ Postura</li><li>▪ Efeitos do exercício físico</li><li>▪ Ritmo circadiano</li><li>▪ Altitude</li><li>▪ Gravidez</li><li>▪ Estilo de vida</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Identificação da amostra</li><li>▪ Efeitos da infusão</li><li>▪ Coleta sanguínea</li><li>▪ Tempo de garroteamento</li><li>▪ Material do tubo de coleta</li><li>▪ Ordem de coleta dos tubos</li><li>▪ Homogeneização da amostra com o anticoagulante</li><li>▪ Anticoagulante</li><li>▪ Confecção da extensão sanguínea sem anticoagulante logo após a coleta</li><li>▪ Transporte e armazenamento inadequados</li><li>▪ Centrifugação</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Presença de anticorpos circulantes contra leucócitos e plaquetas (EDTA dependentes)</li><li>▪ Analitos que provocam interferência</li><li>▪ Efeito de medicamentos e seus metabólitos</li></ul>

EDTA, ácido etilenodiaminotetracético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*).

Fonte: Adaptada de Jury, Nagia e Tatsumi,<sup>4</sup> Mullins,<sup>5</sup> e Narayanan.<sup>6</sup>

ser uma informação bastante útil, pois direciona a análise e fornece segurança no momento de relatar as alterações hematológicas observadas na microscopia. Uma doença hereditária se manifesta, muitas vezes, desde o nascimento. O fato de o paciente informar que estava bem e que passou a ter algum sintoma há pouco tempo, afasta a hipótese de uma doença hereditária ou pode sugerir, por exemplo, o início de uma crise de hemólise.<sup>7</sup>

**▣▣ IDADE, SEXO, RAÇA, JEJUM E POSTURA**

A idade, o sexo e até mesmo a raça são fundamentais para a interpretação dos exames hematológicos, pois os valores de referência foram definidos para diferentes populações e agrupados conforme

gênero e faixa etária. Ocorre um aumento substancial na contagem de glóbulos vermelhos nos recém-nascidos em comparação com a dos adultos em decorrência da glicose ser metabolizada muito rapidamente em neonatos. O aumento do oxigênio arterial logo após o nascimento ocasiona um aumento dos níveis de hemoglobina. Nos recém-nascidos, a contagem de neutrófilos é elevada e atinge um valor máximo entre 1 e 2 dias após o nascimento, enquanto a contagem de monócitos permanece aumentada até duas semanas após o nascimento e a contagem de eosinófilos por até uma semana. A contagem de linfócitos está aumentada significativamente no momento do nascimento e permanece elevada em crianças de até 4 anos de



idade. Já a contagem de basófilos permanece elevada, mas apenas temporariamente, até um dia após o nascimento. Saber se o paciente está em jejum ou não é importante, pois o pós-prandial altera, principalmente, a linhagem leucocitária. Não considerando situações de urgência e emergência, nas quais os exames são solicitados a qualquer momento e sem necessidade de jejum prévio, o período de jejum – habitualmente solicitado para a coleta de hemograma e testes de coagulação – é de 8 horas, podendo ser reduzido para 4 horas sem que haja grandes prejuízos e para 1 ou 2 horas em situações especiais que envolvam crianças de baixa idade e de baixo peso. Mudanças na postura, principalmente quando o paciente passa da posição deitada para a posição em pé ou sentada, provocam deslocamento da água corporal do interior dos vasos para o espaço intersticial, que resulta em hemoconcentração e causa flutuações entre 8 e 10% na hemoglobina, volume globular e contagem de leucócitos em relação à concentração inicial. O correto é padronizar a postura do paciente durante coletas subsequentes; contudo, sempre que possível, recomenda-se fazer a coleta com o paciente sentado.<sup>6-8</sup>

### ⚡ EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E RITMO CIRCADIANO

Perguntar ao paciente o que ele estava fazendo antes da coleta de sangue é importante porque exercícios físicos, deslocamento até o laboratório de bicicleta ou em caminhadas apressadas alteram os exames hematológicos, aumentando a contagem de leucócitos, por fazer um deslocamento dos leucócitos do *pool* marginal para o circulante, assim como a contagem de plaquetas. Exercícios físicos podem influenciar a hemostasia, ativando a coagulação, a fibrinólise e as plaquetas. O horário da coleta se correlaciona com o ritmo circadiano de flutuações que ocorrem com certos hormônios, substâncias e células presentes na corrente sanguínea. Os níveis de ferro e as contagens de eosinófilos aumentam no período da tarde. Deve-se realizar a coleta dos pacientes em condições basais que sejam reprodutíveis e padronizáveis.<sup>4,5,7,8</sup>

### ⚡ ALTITUDE E GRAVIDEZ

Alterações nas contagens sanguíneas podem ocorrer quando realizadas ao nível do mar ou em altitudes elevadas. Por exemplo, o volume globular e a concentração de hemoglobina podem

aumentar cerca de 8% em uma altitude de 1.400m em relação ao nível do mar. A concentração de transferrina diminui com o aumento da altitude. Na gravidez, ocorre um aumento do volume plasmático médio que leva à hemodiluição. A velocidade de hemossedimentação aumenta em até cinco vezes devido à presença de proteínas de fase aguda. Também ocorre aumento dos níveis de fator VII e diminuição dos níveis de ferro e ferritina.<sup>6</sup>

### ⚡ ESTILO DE VIDA

O estresse e a ansiedade podem provocar aumento temporário nas contagens de leucócitos. A ingestão regular de etanol pode provocar aumento do volume corpuscular médio (VCM). Em fumantes de longo prazo, também pode ocorrer aumento do VCM e das concentrações de carboxihemoglobina, hemoglobina e nas contagens de eritrócitos e leucócitos. O aumento dos leucócitos está correlacionado com o número de maços fumados.<sup>6</sup>

### VARIÁVEIS DE COLETA E MANIPULAÇÃO DA AMOSTRA

Para minimizar o erro pré-analítico, algumas variáveis precisam ser padronizadas, como, por exemplo, conferência do nome do paciente, técnica de coleta, tempo de duração da aplicação de garrote (torniquete), locais de coleta, anticoagulantes utilizados para a coleta de sangue, relação sangue/anticoagulante e manuseio e processamento das amostras.

### ⚡ IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Erros de identificação, tanto da amostra como do paciente, levam a subsequentes erros de transcrição de resultados, podendo acarretar a graves erros médicos. O coletador deve se assegurar de que a amostra que será coletada realmente seja do paciente especificado na requisição médica. Esta situação constitui um problema crítico e não deve ser subestimada. Para assegurar uma correta identificação do paciente, deve-se solicitar pelo menos dois ou mais identificadores, tais como nome e data de nascimento, sendo que estas informações devem ser as mesmas que constam na requisição médica. No caso de pacientes hospitalizados, a identificação por meios eletrônicos ou pulseiras com código de barras reduz o risco de erros de identificação dos pacientes. O número do leito nunca deve ser utilizado como critério de identificação. Para recém-nascidos e pacientes



com dificuldades de comunicação, o coletador deve valer-se de informações fornecidas por acompanhante ou equipe de enfermagem. A identificação das amostras deve ser realizada logo após o término da coleta, na presença do paciente e antes de sair do local de coleta. A data e a hora da coleta devem ser registradas no tubo, assim como a identificação do coletador.<sup>8,9</sup>

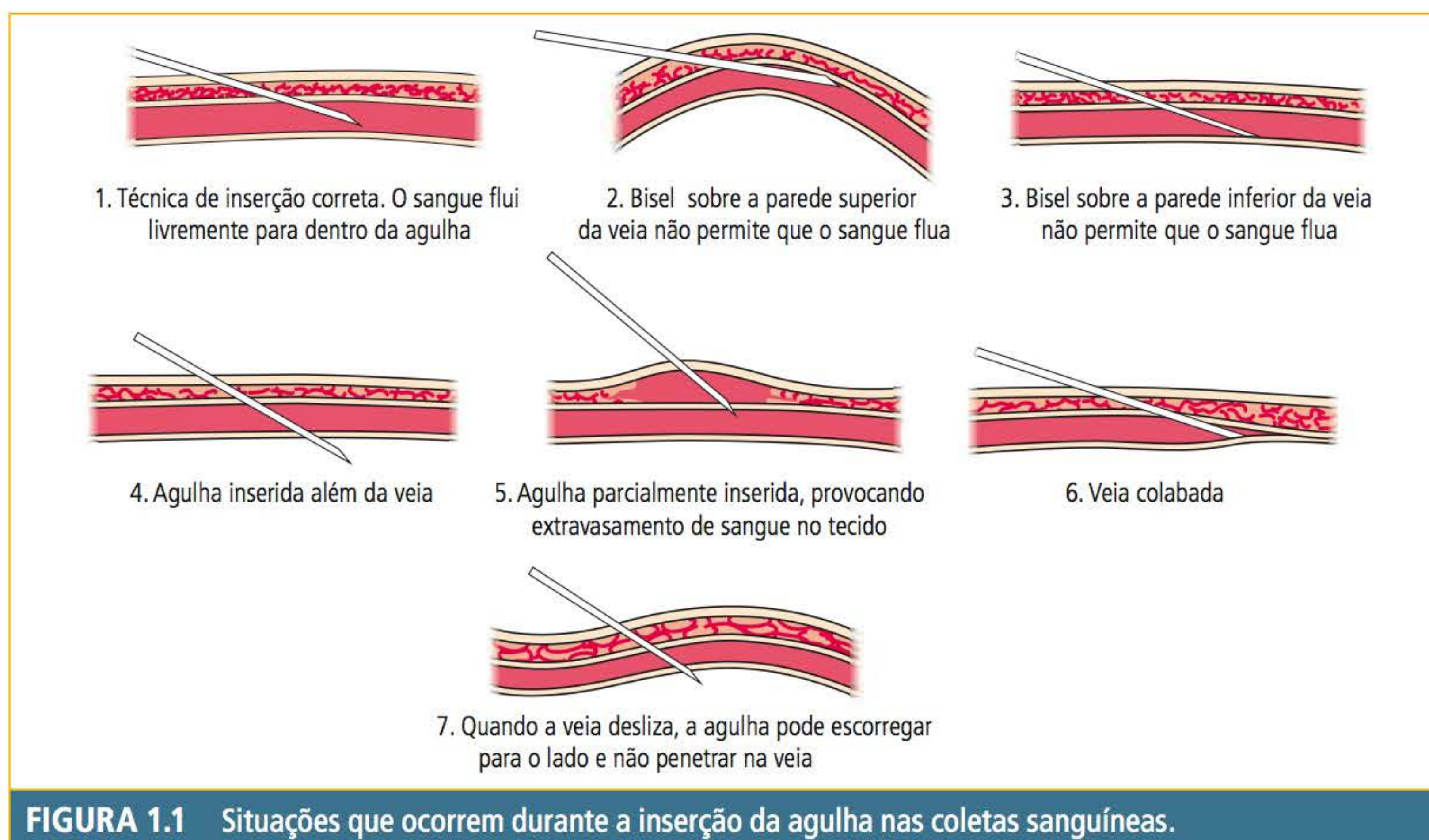
### EFETOS DA INFUSÃO

Nos pacientes que estão recebendo infusão de algum medicamento ou soro fisiológico ou glicosado, as amostras de sangue não devem ser obtidas do local próximo à infusão e sim do braço oposto. Deve-se passar pelo menos 8 horas antes de se coletar sangue de um paciente que recebeu uma emulsão de lipídios. O período de espera para coleta de sangue de pessoas que receberam uma solução rica em carboidratos, ou aminoácidos e proteínas hidrolisadas, ou eletrólitos é de pelo menos 1 hora depois da cessação da infusão. Para indivíduos que receberam transfusões de sangue, a extensão da hemólise e, com isso, o aumento dos valores de potássio, lactato desidrogenase e hemoglobina livre estão diretamente relacionados com o tempo decorrido entre a produção do concentrado de hemácias e a transfusão propriamente dita.<sup>6</sup>

### COLETA SANGUÍNEA

A coleta de sangue deve ser padronizada pelos laboratórios a fim de evitar contagens espúrias e artefatos gerados *in vitro*. A coleta sanguínea inclui a punção venosa, o uso do anticoagulante adequado, a correta homogeneização da amostra após ser transferida para o tubo e, conforme o laboratório, a confecção da extensão sanguínea sem anticoagulante. A punção sanguínea pode ser realizada pelo sistema a vácuo e por seringa e agulha. Na primeira situação, os tubos só devem ser retirados do suporte após o preenchimento total do tubo; isso vai garantir uma correta proporção de sangue e anticoagulante. Logo após o tubo ser retirado do suporte, ele deve ser homogeneizado gentilmente por inversão. Isso garante a completa solubilização do anticoagulante e a correta anticoagulação da amostra de sangue. Deve-se sempre verificar a data de validade dos tubos, uma vez que eles vão perdendo o vácuo ao longo do tempo, o que pode resultar em relações sangue/anticoagulante inadequadas.

Quando a punção é realizada com seringa e agulha, o sangue deve fluir para o interior da seringa sem que se tenha de fazer qualquer esforço para puxar o êmbolo. Quando isso não ocorre, o turbilhonamento ocasionado pelo esforço causa alterações celulares. A **Figura 1.1** mostra a correta



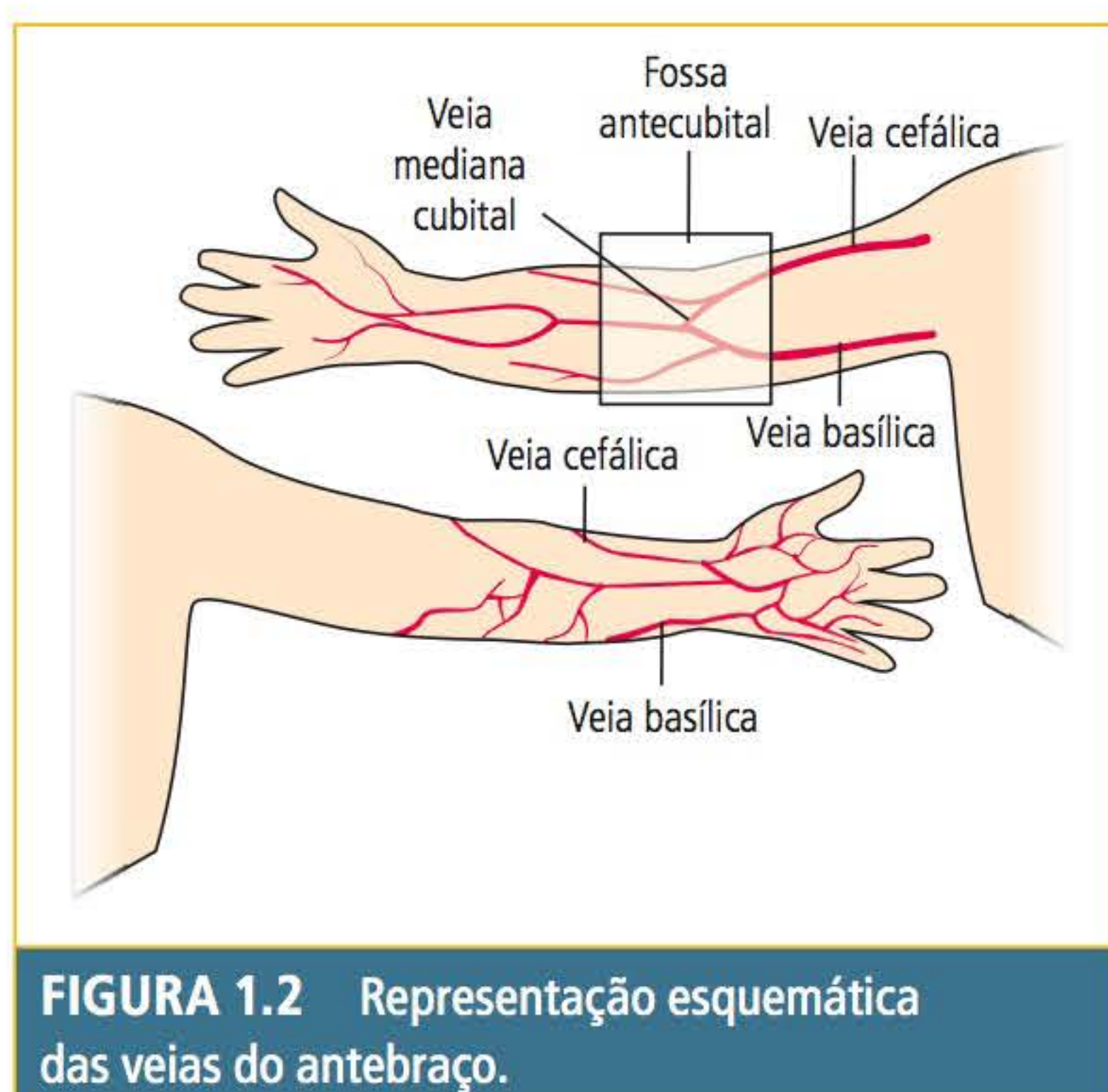
**FIGURA 1.1** Situações que ocorrem durante a inserção da agulha nas coletas sanguíneas.

Fonte: Adaptada de McCall e Tankersley.<sup>10</sup>



técnica de inserção da agulha (1) e problemas que podem prejudicar a coleta, mas que devem ser contornados por um coletador experiente.

Terminada a punção, a agulha deve ser retirada da seringa e o sangue passado aos tubos, respeitando a proporção de sangue e anticoagulante.<sup>7</sup> Para a coleta dos exames hematológicos, a preferência é pela coleta de sangue venoso e a partir da punção das veias do antebraço: mediana cubital, cefálica ou basílica. Sempre ambos os antebraços devem ser observados, e a punção, realizada na veia mais visível. Antes da punção, deve-se fazer assepsia com álcool a 70%. A **Figura 1.2** mostra a representação esquemática das veias do antebraço.



**FIGURA 1.2** Representação esquemática das veias do antebraço.

Fonte: Adaptada de Mullins.<sup>5</sup>

Em crianças, quando o acesso venoso é difícil, a coleta na jugular externa pode ser uma boa opção, mas também pode ser realizada a punção capilar. A coleta do sangue capilar deve ser feita nas partes externas, medial e lateral do calcanhar, sendo que este deve estar aquecido. A punção deve ser feita com lanceta apropriada, após assepsia, e o sangue deve verter espontaneamente, sem que nenhuma compressão seja feita com a intenção de aumentar o fluxo sanguíneo. Existem diferenças nos resultados de alguns parâmetros hematológicos entre o sangue capilar e o venoso. Para alguns autores, o volume globular, a concentração da hemoglobina, contagem de eritrócitos, leucócitos, neutrófilos e monócitos são mais elevados no sangue capilar, e a contagem de plaquetas é mais elevada no sangue venoso, talvez por adesão das mesmas no local da punção capilar.<sup>4</sup> Já outros autores relatam que a contagem de eritrócitos, volume

globular e a hemoglobina são menores no sangue capilar em relação ao venoso.<sup>11</sup> A concordância entre esses autores se dá na contagem de plaquetas. A **Figura 1.3** exemplifica os locais para a realização da punção capilar.



**FIGURA 1.3** Locais para a realização da punção capilar.

Fonte: Adaptada de Mullins.<sup>5</sup>

Em idosos ou em pacientes com a pele flácida, após a escolha da veia a ser puncionada, a pele deve ser bem distendida com ajuda do polegar para evitar sangramentos subcutâneos. Em situações em que o paciente esteja com um cateter para a infusão de soros e medicamentos, a punção sanguínea pode ser feita pelo próprio cateter. Contudo, uma determinada quantidade de sangue, diluída pelo líquido de infusão, deve ser descartada para que se possa utilizar a amostra para a realização de exames hematológicos. Quando o volume descartado é menor que o recomendado, podem ocorrer alterações no volume globular e nos leucócitos espuriamente para menos. Recomenda-se que o volume descartado seja pelo menos 4 vezes maior que o volume do espaço morto do cateter, o qual depende do seu comprimento e do seu diâmetro. Os resultados do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) são inversamente proporcionais ao volume descartado em pacientes heparinizados. Isso significa que, se o volume descartado não for o ideal, ocorre aumento do TP e TTPa por interferência da heparina. Não se recomenda que exames para avaliação da hemostasia sejam coletados do cateter; caso seja necessário, um volume mínimo de 30 mL deve ser descartado, especialmente se o tempo de trombina (TT) for determinado.<sup>11</sup>



Quando a coleta é realizada com sistema de escalpe, sendo o tubo com citrato o primeiro a ser coletado, deve-se utilizar um tubo de descarte. O uso do tubo de descarte tem por finalidade preencher o espaço morto do escalpe, de modo a garantir a proporção adequada do anticoagulante em relação ao sangue total. Para fins de descarte, pode-se utilizar os próprios tubos de citrato ou tubos sem qualquer aditivo.<sup>12</sup>

Amostras que chegam ao setor de hematologia com volume menor do que o volume nominal do tubo ou visivelmente hemolisadas não devem ser processadas. A primeira pode conter alterações celulares causadas pelo anticoagulante, e a última, ser reflexo de uma coleta traumática.<sup>6</sup>

A gasometria é muito solicitada em laboratórios que atendem a domicílio e a hospitais, incluindo leitos de enfermarias, apartamentos, berçário ou unidade de terapia intensiva, e esse exame exige coleta de sangue arterial, o qual, muitas vezes, é encaminhado ao laboratório na própria seringa, sem que haja divisão prévia da amostra para os demais exames solicitados. A divisão posterior para realização do hemograma não deve ser feita porque não se consegue a perfeita homogeneização do sangue no interior da seringa. Quando junto à solicitação de gasometria também se tem a do hemograma, a amostra sanguínea deve ser separada no momento da coleta. A lâmina deve ser confeccionada logo após o término da punção, não sendo recomendado que ela seja feita no laboratório, porque a gasometria é coletada com heparina e esta interfere na coloração das células. Outra situação em relação a pacientes internados (algumas vezes, pacientes ambulatoriais) é que a coleta pode ser difícil e a amostra inadequada para o exame, mas, por insistência médica ou por se querer cumprir a prescrição solicitada, ela é encaminhada para realização de exames hematólogicos. Esse tipo de amostra não é apropriado para a realização de exames hematólogicos, porque a interpretação do exame pode ficar muito comprometida. Muitas vezes, esse resultado inadequado pode ser comparado com outro em que a coleta não estava difícil e não se tem uma explicação para a variação entre os resultados.

Em muitos hospitais com UTI (geral ou neonatal) ou com berçário, a coleta não é realizada pelo laboratório. Nessas situações, a responsabilidade sobre a coleta é do profissional que a executa e não do laboratório, que passa a ser um executor

do material que lhe foi enviado e que não tem responsabilidade sobre troca de amostras, sobre as condições de coleta (traumáticas) e sobre o uso do anticoagulante (foi usado o anticoagulante correto? A relação sangue/anticoagulante foi obedecida?). Essa responsabilidade deve estar documentada pelo laboratório junto ao(s) responsável(eis) pela coleta e, no laudo, deve ser escrito “amostra enviada ao laboratório”.

Uma causa grave e potencialmente fatal de erro pré-analítico é a troca de amostra ou coleta de sangue de um paciente em um tubo identificado com o nome de outro, que gera um erro subsequente de transcrição do resultado. Esses erros podem ocorrer em qualquer fase e, apesar dos sistemas informatizados com código de barras para a identificação das amostras dos pacientes, é essencial ter um processo de verificação cruzada.

É interessante que o laboratório oriente e esclareça o paciente sobre os riscos de uma punção sanguínea, um processo invasivo que pode ter como consequência a formação de hematoma, o que judicialmente caracteriza lesão corporal. No dia da coleta, o paciente não deve realizar tarefas que exijam esforço físico com o braço que sofreu a punção. Essas orientações podem estar afixadas na sala de coleta (em local perfeitamente visível) ou ser entregues ao paciente antes da coleta. Alguns laboratórios, ao cadastrar o paciente, geram um documento que contém as informações sobre os riscos da coleta. O paciente, após a leitura, dá ciência no documento.

## ⚡ TEMPO DE GARROTEAMENTO

O tempo de garroteamento (aplicação do torniquete) não deve ultrapassar 1 minuto e, logo após a entrada do sangue no bisel da agulha, ele deve ser liberado. Um garroteamento além desse tempo ocasiona estase localizada, hemoconcentração, hemólise e infiltração de sangue nos tecidos, resultando em aumento do volume globular e alterações no TP, TTPa, fibrinogênio, D-dímeros e fatores da coagulação. A coleta de alguns testes especiais de coagulação, como o fragmento 1+2 da protrombina (PF1.2) e o complexo trombina-antitrombina (TAT), deve ser realizada sem o uso de garrote, pois pode provocar elevações espúrias desses marcadores, particularmente se o tempo de garroteamento ultrapassar 1 minuto. Caso, na procura de uma veia, o paciente fique garroteado por muito tempo, quando a veia for localizada, o garrote deve ser liberado e, após a



normalização da circulação, em torno de 2 minutos, garroteia-se novamente para proceder a punção. Todos os fatores relacionados com os procedimentos de coleta são de responsabilidade dos profissionais do laboratório. Esses profissionais devem entender plenamente a importância da coleta e dos fatores técnicos sobre o resultado dos exames hematológicos e devem ser reciclados periodicamente, no sentido de sempre melhorarem a qualidade dos serviços prestados.<sup>11,13,14</sup>

ORDEM DOS TUBOS NA COLETA DE SANGUE

No momento da coleta, durante a troca de tubos, existe a possibilidade de contaminação de um tubo para outro com microrganismos, aditivos e líquido tecidual. Este último possui especial importância nos testes de coagulação, tanto que, na década de 1940, Armand Quick, o inventor do TP, afirmou que “suco de tecido” é o interferente externo mais importante que pode influenciar a coagulação e que qualquer traço desse suco deveria ser excluído das amostras a serem analisadas.<sup>15</sup> O documento H3-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>14</sup> preconiza uma ordem de coleta para os tubos a vácuo cuja sequência é apresentada na **Tabela 1.1**.

Nas punções capilares, recomenda-se que o primeiro tubo seja o de EDTA ou outro tubo com anticoagulante, caso não tenha sido solicitado o hemograma. Esse procedimento proporciona mais acurácia aos testes hematológicos.

MATERIAL DO TUBO DE COLETA (VIDRO OU PLÁSTICO)

Por muitos anos, os tubos de vidro foram o padrão para se obterem amostras de sangue em laboratórios clínicos. Contudo, devido ao interesse crescente pela segurança dos profissionais do laboratório, além da necessidade de facilitar a eliminação de resíduos biológicos, tubos de plástico foram desenvolvidos. Os tubos de plástico possuem algumas vantagens sobre os de vidro: maior resistência a choques mecânicos, maior tolerância a altas velocidades de centrifugação, menor formação de resíduos sólidos após incineração, além de serem mais flexíveis para uso em laboratórios automatizados e com manuseio de amostras por meio de sistemas robotizados.

Nos exames de coagulação, quando se utilizam tubos de vidro, a própria superfície interna do tubo pode atuar como ativador dos fatores de contato (cininogênio de alto peso molecular, pré-caliceína, fator XI e XII), além de haver elevado risco de os

TABELA 1.1    Ordem dos tubos de coleta e as razões para tal ordem			
ORDEM DE COLETA	TIPO DO TUBO	COR DA TAMPA	RAZÕES
1	Hemocultura	Geralmente amarela	Minimizar as chances de contaminação bacteriana
2	Tubos com citrato de sódio para coagulação	Azul	Deve ser o primeiro tubo com anticoagulante, pois todos os demais anticoagulantes e aditivos alteram os testes de coagulação
3	Tubos com citrato de sódio para VHS automatizado	Preta	Minimizar as chances de contaminação por outro anticoagulante senão o próprio citrato
4	Tubos de vidro para soro e sem aditivos	Vermelha	Prevenir a contaminação por aditivos de outros tubos
5	Tubos de plástico para soro, com ativador de coágulo, com ou sem gel separador	Amarela ou vermelha	Devem ser preenchidos após os tubos de coagulação, pois as partículas de sílica ativam a coagulação e alteram os seus testes
6	Tubos com heparina com ou sem gel separador de plasma	Verde	A heparina altera os testes de coagulação e interfere na obtenção de soro
7	Tubos com EDTA	Roxa	O EDTA é o maior responsável por problemas de arraste. Eleva os resultados de TP e o TTPa. Diminui os níveis de ferro
8	Tubos com oxalato/fluoreto de sódio	Cinza	Aumenta os níveis de sódio e de potássio e altera a morfologia dos eritrócitos

VHS, velocidade de hemossedimentação; EDTA, ácido etilenodiaminotetracético; TP, tempo de protrombina; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativada.  
**Fonte:** Adaptada de McCall e Tankersley<sup>10</sup> e Clinical and Laboratory Standards Institute.<sup>14</sup>



vidros se quebrarem e provocarem cortes e exposição a material infectante. Embora os tubos de coagulação possam ser de vidro ou plástico, os valores de referência podem variar se a amostra é coletada em tubo de vidro ou em tubo de plástico. Para evitar essa situação, os laboratórios devem padronizar o tipo do material do tubo utilizado.<sup>11,13</sup> Em relação ao hemograma, não há diferenças evidentes e clinicamente significativas sobre o uso de tubos com EDTA compostos de vidro ou de plástico.<sup>16</sup>

### ■ HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS APÓS A COLETA DE SANGUE

Logo após a coleta, os tubos devem ser homogeneizados suavemente por inversão para que o anticoagulante se misture adequadamente na amostra. Não se deve homogeneizar vigorosamente os tubos de citrato, sob o risco de hemolisar *in vitro* e promover a ativação das plaquetas e fatores da coagulação, interferindo, dessa forma, nos testes de coagulação. A homogeneização inadequada da amostra promove a formação de microcoágulos pelo fato do anticoagulante não se dissolver adequadamente. O documento H3-A6 do CLSI<sup>14</sup> preconiza que os tubos destinados ao hemograma precisam ser homogeneizados gentilmente por inversão durante 8 a 10 vezes, e os tubos destinados a testes de coagulação e VHS precisam, pelo menos, de 3 a 6 suaves inversões.

### ■ HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PREVIAMENTE À FASE ANALÍTICA

Há um intervalo de tempo, entre a coleta e a realização do exame, em que o tubo fica parado e ocorre a sedimentação dos eritrócitos. Para que a amostra possa ser contada adequadamente, ela deve ser homogeneizada antes do exame, em homogeneizadores hematológicos por 5 minutos, sobretudo, se o analisador hematológico não possuir sistema de carregamento de amostras em *racks*. Caso possua, deve-se fazer uma validação do mecanismo homogeneizador do contador. Para isso, analisa-se uma *rack* com 10 amostras aleatórias, previamente homogeneizadas durante 5 minutos. Em seguida, deixa-se as amostras repousarem durante 4 horas para, após, serem analisadas diretamente e sem prévia homogeneização. A homogeneização será feita pelo mecanismo homogeneizador do analisador. Compara-se a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A variação máxima permitida entre esses dois procedimentos

é: eritrócitos ( $\pm 1,5\%$ ); leucócitos ( $\pm 3\%$ ) e plaquetas ( $\pm 5\%$ ). Amostras que vão ser recontadas e que estavam em repouso por algum tempo devem ser homogeneizadas por 15 minutos, principalmente quando se quer confirmar a contagem de plaquetas. Amostras refrigeradas, antes de serem homogeneizadas, devem adquirir a temperatura ambiente.

### ■ ANTICOAGULANTES

Os anticoagulantes mais comumente utilizados para exames hematológicos são o EDTA, a heparina e o citrato de sódio. O sangue coletado deve ser anticoagulado com uma concentração adequada do anticoagulante, sobretudo para evitar erros resultantes de uma relação sangue/anticoagulante inadequada. Idealmente, as amostras sanguíneas normais devem ser processadas em até 4 horas após a coleta e as anormais em até 1 hora depois. A dificuldade no laboratório é saber se a amostra é normal ou não; ele deve, então, estabelecer um protocolo que determine o tempo em que as amostras devem ser processadas e esse tempo deve ser o mais rápido possível. Na sequência, serão descritas as características dos principais anticoagulantes utilizados na hematologia, assim como possíveis problemas resultantes de uma relação sangue/anticoagulante inadequada ou de um tempo de estocagem prolongado.

#### Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Embora uma ampla variedade de anticoagulantes tenha sido utilizada no passado na realização do hemograma, incluindo vários tipos de soluções de oxalato e até mesmo a heparina, o quelante de cálcio, chamado ácido etilenodiaminotetracético (EDTA –  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ), ou alguns dos seus sais, tornaram-se os principais anticoagulantes para a coleta de amostras destinadas à realização de hemogramas. Na molécula do EDTA, existem quatro hidrogênios simétricos que podem ser substituídos por potássio, sódio ou lítio, de modo a formar sais de EDTA que possuem elevada solubilidade no sangue. O EDTA exerce seu efeito por meio de uma forte ligação ao cálcio iônico presente no plasma, bloqueando efetivamente a coagulação e a agregação plaquetária. Apesar disso, o EDTA não pode ser utilizado para o estudo dos fatores da coagulação pelo fato de provocar mudanças na estrutura química do fator V, fibrinogênio e trombina. A quantidade de EDTA necessária para a completa quelação do cálcio é balanceada



com o desejo de minimizar os danos celulares, de modo que o International Council for Standardization in Haematology (ICSH) estabeleceu uma faixa de concentração ideal que pode variar de 1,5 a 2,2 mg do sal por mililitro de sangue. O EDTA- $K_2$  e o EDTA- $Na_2$  são disponibilizados na forma de um *spray* seco que reveste a parede dos tubos. O EDTA- $K_2$  é mais solúvel que o EDTA- $Na_2$  (1.650 g/L contra 108 g/L, respectivamente), sendo, por essa razão, o sal recomendado para uso rotineiro pelo ICSH. O EDTA- $K_2$  também elimina efeitos dilucionais nas amostras, especialmente as de pequeno volume. O EDTA- $K_3$  é comercializado na forma líquida e pode diluir levemente as amostras. Além disso, os eritrócitos podem ser contraídos devido a um efeito osmótico mais pronunciado que os demais sais do EDTA, resultando em uma diminuição do volume globular de cerca de 2 a 3% nas primeiras 4 horas.<sup>4,14,17-19</sup>

A título de curiosidade, o EDTA também existe na forma de EDTA- $Li_2$  e EDTA- $Na_3$ . O sal lítio (EDTA- $Li_2$ ) é efetivo em relação à ação anticoagulante, possuindo uma solubilidade de 160 g/L, além de poder ser utilizado para dosagens bioquímicas; contudo, é menos solúvel que o EDTA- $K_2$ . Já o EDTA- $Na_3$ , comercializado na forma líquida, não é recomendado por possuir pH elevado, que pode afetar adversamente proteínas do plasma e até mesmo tubos de coleta feitos de vidro.<sup>4,14,17-19</sup>

Em muitos laboratórios clínicos, é comum o fato de amostras de sangue chegarem com atraso de 2 dias ou mais. Quando essas amostras chegam ao laboratório, é comum surgirem dúvidas sobre aceitá-las ou não, quais parâmetros analisar quando a amostra for aceita e quais comentários reportar no laudo, considerando a confiabilidade ou não dos resultados. Essas decisões requerem experiência e conhecimento dos profissionais do laboratório, sobretudo em relação às mudanças que ocorrem nas amostras de sangue durante o período de armazenamento.

Quando a amostra é coletada em EDTA di ou tripotássico e, em seguida, armazenada em repouso na temperatura ambiente (18 a 25 °C), a contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e os índices hematimétricos são, em geral, estáveis por até 8 horas após a coleta da amostra. A partir desse período, mudanças começam a acontecer; contudo, em até 24 horas de armazenamento, os resultados ainda se encontram dentro do limite de erro permitido de Tonks.<sup>19,20</sup>

Contagens hematológicas realizadas em amostras coletadas em EDTA e armazenadas a 4 °C não apresentam erros significativos durante as primeiras 24 horas. Assim, o sangue pode ser seguramente armazenado em refrigerador, ao longo de uma noite, para ser analisado no dia seguinte, desde que cuidados contra o congelamento sejam tomados. Tem sido sugerido que os resultados de hemogramas de amostras coletadas em EDTA devam permanecer dentro de  $\pm 5\%$  dos valores iniciais quando armazenados a 4 °C durante 24 horas.<sup>4,19,21</sup>

Tempo de armazenamento acima de 24 horas pode produzir resultados conflitantes e pouco reprodutíveis, independentemente do desempenho analítico e da metodologia empregada no analisador hematológico, haja vista ocorrer oscilação da estabilidade dos parâmetros hematológicos nesses tipos de amostra. Há parâmetros, como a contagem de leucócitos, que são estáveis por 24 horas em temperatura ambiente e por até 48 horas a 4 °C. Todavia, diferenças são encontradas, especialmente quando métodos de contagem baseados no princípio da impedância são utilizados.<sup>19</sup>

A contagem absoluta de linfócitos pode diminuir progressivamente ao longo do tempo, podendo chegar a até 50% da contagem inicial após 72 horas de armazenamento. Em situações especiais, como a utilização da contagem absoluta de linfócitos para quantificar  $CD_4^+$ , a amostra deve ser processada dentro de poucas horas e nunca ser armazenada previamente.<sup>19</sup>

Depois de 8 horas de armazenamento em temperatura ambiente, o VCM aumenta em uma taxa progressiva de 3 a 4 fL a cada 24 horas. Tal efeito não é observado se a amostra for armazenada a 4 °C por até 24 horas. As contagens de reticulócitos geralmente são confiáveis por até 24 horas a 4 °C quando coletadas em EDTA; entretanto, em temperatura ambiente, a contagem começa a diminuir dentro de 6 horas. Os eritroblastos tendem a desaparecer da amostra dentro de 1 a 2 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Dentro de 48 a 72 horas, e especialmente em temperatura ambiente alta, começa-se a observar hemólise nas amostras, fato este que resulta em diminuição da contagem de eritrócitos e do volume globular, com aumento da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) calculado.<sup>4,19,21</sup>

Percebe-se que alguns parâmetros são mais estáveis quando mantidos em temperatura ambiente



e outros quando refrigerados a 4 °C. Portanto, para que resultados equivocados não sejam gerados e liberados, deve-se evitar analisar amostras além de 24 horas de armazenamento, independentemente da temperatura.

Longos períodos de armazenamento das amostras coletadas em EDTA provocam mudanças significativas na morfologia das células sanguíneas. Os neutrófilos podem apresentar mudanças no núcleo, o qual se cora mais homogeneamente que em sangue fresco, tornando-se, às vezes, picnóticos e apresentando figuras de cariorréxis. Pode-se ainda observar margens celulares irregulares e menos definidas, e alguns vacúolos podem aparecer no citoplasma. Os monócitos e os linfócitos sofrem mudanças semelhantes, podendo apresentar pequenos vacúolos citoplasmáticos e lobulação irregular do núcleo.<sup>4,19</sup>

Já os eritrócitos podem apresentar crenação e esferotização após longos períodos de armazenamento em contato com o EDTA. Todas as alterações morfológicas citadas anteriormente diminuem quando a amostra é mantida a 4 °C, mas não são eliminadas, tornando imprescindível a confecção de extensões sanguíneas o mais breve possível após a coleta da amostra. Trabalhos sugerem que um atraso de 3 horas na confecção da extensão é permitido sem maiores interferências.<sup>4,19</sup>

O fato de laboratórios utilizarem diferentes formas de EDTA pode, em alguns casos, dificultar a comparabilidade de resultados. Esse erro é agravado pelo fato de que, algumas vezes, pouco cuidado é despendido para garantir a proporção correta de sangue/anticoagulante na amostra.

### Heparina

A heparina é um mucopolissacarídeo com características ácidas e exerce ação anticoagulante por ser um inibidor da molécula de antitrombina. Consequentemente, acelera a inibição dos fatores Xa, IXa e trombina. A heparina está disponível na forma de sais de lítio, sódio e amônio. Ela preserva a forma e o volume dos eritrócitos e é usada em vários testes que avaliam a série vermelha, sendo o anticoagulante de escolha para a realização do teste de fragilidade osmótica, além de ser o mais adequado para a imunofenotipagem por manter os leucócitos viáveis de um dia para o outro. A heparina não é adequada para o hemograma devido ao fato de induzir aglutinação de leucócitos e plaquetas. Outra contraindicação é que as extensões

sanguíneas realizadas a partir de amostras coletadas com heparina apresentam uma coloração de fundo avermelhada, e as bordas celulares ficam realçadas na mesma cor. A heparina inibe a atividade enzimática e não deve ser utilizada na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com enzimas de restrição. Recomenda-se utilizar a heparina na concentração de 10 a 30 U/mL de sangue.<sup>4,11</sup>

### Citrato de sódio

O anticoagulante de escolha para o estudo dos fatores da coagulação é o citrato de sódio (tubo com tampa azul). A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o documento H21-A5 do CLSI<sup>12</sup> recomendam o uso do citrato de sódio 3,2% (109 mmol/l), com o citrato na forma di-hidratada ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), em vez do citrato de sódio 3,8% (129 mmol/l), embora ambos sejam adequados para os testes de coagulação.<sup>12,22</sup> Para reduzir a variabilidade nos testes de coagulação, os laboratórios devem padronizar a concentração do citrato e utilizar valores de referência apropriados para a concentração utilizada. O tempo para a formação do coágulo *in vitro* tende a ser maior na presença do citrato 3,8% do que na do 3,2% pelo fato de que quanto maior a concentração de citrato, mais cálcio adicionado no ensaio será quelado, o qual se torna menos disponível para possibilitar a formação do coágulo. Laboratórios de apoio que recebem amostras aliquotadas de plasma congelado devem ficar em alerta para a possibilidade dessas amostras terem sido coletadas com outros anticoagulantes, uma vez que o EDTA e a heparina alteram os testes de coagulação.

A relação sangue/anticoagulante é de 1:9, uma parte de anticoagulante para 9 partes de sangue. O citrato de sódio exerce sua atividade anticoagulante devido à sua habilidade em quelar o cálcio, o qual é um componente fundamental para formação do coágulo. Tubos preenchidos com sangue em níveis abaixo do volume adequado possuem proporção aumentada de citrato em relação ao sangue, o que permite aumentar a quelação de cálcio e pode levar a um aumento dos testes de coagulação. Tubos subpreenchidos com sangue em citrato 3,8% são mais propensos à prolongação do tempo dos testes de coagulação que aqueles com citrato 3,2%, pelo fato de que quanto maior for a concentração de citrato, mais cálcio adicionado ao ensaio será quelado. Tubos subpreenchidos mostram elevações significati-



vas dos resultados quando o volume for menor que 75 a 90% do recomendado.<sup>13,23</sup>

Tubos preenchidos com sangue além do volume nominal do tubo podem limitar o procedimento de homogeneização da amostra, resultando em formação de microcoágulos *in vitro*. É proibido combinar 2 amostras de citrato do mesmo paciente, pois pode levar à duplicação da concentração e anticoagulante além da diluição da amostra, prolongando o tempo dos testes.

A relação sangue/anticoagulante de 9:1 é válida para valores de volume globular (VG) ou hematócrito (HT) de 45%, com uma variação permitida entre 25 e 55%. Valores de VG ou HT abaixo ou acima desta variação devem ter a quantidade de anticoagulante corrigida, pois o citrato se distribui apenas no plasma e não entra nas células. Amostras com VG > 55% mimetizam os efeitos de tubos subpreenchidos devido à menor quantidade de plasma disponível. Para exemplificar como deve ser feita a correção do anticoagulante, pode-se supor que o laboratório colete 4,5 mL de sangue para 0,5 mL de anticoagulante (relação 1:9).

**Para um VG de 45%, tem-se 55 mL de plasma em 100 mL de sangue total. Então:**

55 mL de plasma ..... 100 mL de sangue total (VG 45%)  
 x mL de plasma ..... 4,5 mL de sangue total  
 $x = 2,475$  mL de plasma em 4,5 mL de sangue total  
 para um VG de 45%.

**Caso o paciente tenha um VG de 70%, terá 30 mL de plasma. Então:**

30 mL de plasma ..... 100 mL de sangue total (VG 70%)  
 x mL de plasma ..... 4,5 mL de sangue total  
 $x = 1,35$  mL de plasma em 4,5 mL de sangue total  
 para um VG de 70%.

**Deve ser utilizado 0,5 mL de anticoagulante para 2,475 mL de plasma (VG = 45%). O paciente em questão tem 1,35 mL de plasma; portanto, não pode ser utilizada a mesma quantidade de anticoagulante. A correção é feita pelo seguinte cálculo:**

0,5 mL de anticoagulante ..... 2,475 mL de plasma (VG 45%)  
 x mL de anticoagulante ..... 1,35 mL de plasma (VG 70%)  
 $x = 0,27$  mL de anticoagulante para um VG de 70%.

Conforme documento H21-A5 do CLSI,<sup>12</sup> amostras com VG acima de 55% também podem ter a quantidade de citrato corrigida pela seguinte fórmula:

$$C = (1,85 \times 10^{-3}) \times (100 - VG) \times (V)$$

C = volume de citrato que deve permanecer no tubo  
 VG = volume globular do paciente  
 V = volume de sangue que será coletado  
 $1,85 \times 10^{-3}$  = constante da fórmula

Considerando o exemplo anterior:

$$C = (1,85 \times 10^{-3}) \times (100 - 70) \times (5)$$

$C = 0,27$  mL de anticoagulante para um VG de 70%.

No exemplo proposto, caso a quantidade de anticoagulante não seja corrigida, haverá um excesso de 0,23 mL de anticoagulante, e esse excesso presente no plasma coletado irá inibir o cálcio utilizado na realização do TP (tromboplastina cálcica) e do TTPa (adição de  $\text{CaCl}_2$ ). A inibição do cálcio (combinado com o anticoagulante em excesso) fará com que aumente o resultado do TP e do TTP. Caso o VG do paciente esteja abaixo da variação permitida, haverá falta de anticoagulante, levando à formação de coágulos ou microcoágulos, ativando ou consumindo os fatores da coagulação, com resultados para mais ou para menos do valor real. Na prática, observa-se que VG abaixo da variação não tem o resultado tão alterado, mas valores acima da variação mostram resultados bastante alterados. Sempre que o valor do VG estiver fora da variação permitida, a quantidade de anticoagulante deve ser corrigida.

O correto seria que, antes de coletar sangue para TP ou TTPa, fosse feito o VG ou HT do paciente e, posteriormente, o sangue citratado fosse coletado na relação correta. Como esse procedimento é inviável na rotina laboratorial, deve ser padronizado que, após a centrifugação da amostra sanguínea, seja avaliada a relação dos eritrócitos sedimentados pelo plasma. É fácil evidenciar a quantidade de plasma com relação aos eritrócitos quando o VG está abaixo de 25 ou acima de 55%. Caso tenha sido solicitado hemograma do paciente, sabe-se qual o valor do VG e se a quantidade de anticoagulante deve ou não ser corrigida. Caso haja necessidade de corrigir a quantidade de anticoagulante, uma recoleta deve ser solicitada.

Uma maneira simples de superar os efeitos do citrato nas amostras com VG elevado, considerando que, na maioria das vezes, as amostras apresentam VG entre 55 e 65%, é remover 20% do volume de citrato de sódio contido no tubo de coleta.

O tempo entre a coleta e a análise depende do exame a ser realizado e da temperatura de arma-



zenamento. A **Tabela 1.2** contém o tempo de armazenamento dos principais exames de acordo com a temperatura.

Os cuidados pré-analíticos são críticos para manter a integridade da amostra e a qualidade dos resultados em hemostasia. O **Quadro 1.3** resume informações sobre fontes de erro pré-analítico e condições que tornam a amostra ideal ou não.

**:: CONFEÇÃO DAS EXTENSÕES SANGÜÍNEAS LOGO APÓS A COLETA**

As extensões sanguíneas confeccionadas com sangue sem anticoagulante e imediatamente após a coleta devem permanecer em temperatura ambiente até secarem completamente. Não se deve assoprar ou utilizar secadores ou ventiladores para secar as extensões, nem deixá-las em temperatura ambiente durante mais de 5 horas, pois tudo isso pode resultar em artefatos inaceitáveis, como equinócitos, esferócitos e leucócitos degenerados.

As amostras devem ser transportadas para o laboratório o mais rápido possível, mas caso não sejam, elas devem ser fixadas com metanol a fim de preservar as características intrínsecas de cada tipo celular.<sup>25</sup> No Capítulo 3, Fase analítica: Análise morfológica do sangue periférico e sua correlação com o hemograma, estão descritas as técnicas de confecção e coloração das lâminas.

**:: TRANSPORTE E PROCESSAMENTO**

As amostras devem ser acondicionadas em maletas que ofereçam garantia de biossegurança no transporte, assim como resistência a choque e variações de temperatura e pressão. De um modo geral, as amostras devem ser transportadas para o laboratório em temperatura ambiente (15-22 °C) e no menor tempo possível. O ideal é que as amostras de TP e TTPa sejam processadas dentro de 4 horas após a coleta. Já as amostras de hemograma devem ser processadas em até 6 horas quando

TABELA 1.2 Tempo de armazenamento dos principais testes de coagulação conforme a temperatura			
EXAME	TEMPERATURA AMBIENTE	2 A 8 °C	-20 °C
TP	24 h, centrifugado ou não	Não armazenar	2 semanas
TTPa	4 h	4 h	2 semanas
TT	4 h	Não armazenar	2 semanas
Fibrinogênio	24 h, se centrifugado	Não armazenar, pois o fibrinogênio pode precipitar	2 semanas
Proteína C e S	4 h	Não armazenar	6 meses
Fatores	Nunca armazenar em temperatura ambiente	Não armazenar	2 semanas

Fonte: Adaptada de Adcock<sup>13</sup> e Medeiros Jr e Munhoz.<sup>24</sup>

QUADRO 1.3 Fontes de erro pré-analítico e condições da amostra em hemostasia		
FONTES DE ERROS PRÉ-ANALÍTICOS	CONDIÇÕES IDEAIS DA AMOSTRA	CAUSAS DE REJEIÇÃO DA AMOSTRA
Preenchimento incompleto do tubo	Coleta sem trauma e com uso mínimo do torniquete	Amostra coletada em outro anticoagulante que não seja o citrato
Uso de outro anticoagulante que não seja o citrato	Preencher o tubo adequadamente, conforme volume nominal	Amostras totalmente coaguladas ou com microcoágulos
Adicionar sangue de outro tubo para preencher um tubo de citrato subpreenchido	Homogeneizar a amostra suavemente por 5-8 inversões	Amostras preenchidas com < 75% do volume nominal do tubo
Homogeneização inadequada	Transportar a amostra rapidamente para o laboratório e em temperatura ambiente	Amostras preenchidas demasiadamente
Armazenar amostra não centrifugada em congelador	Centrifugar dentro de 1 h após a coleta	Amostras hemolisadas por provocarem flutuações nos resultados
Demora no transporte da amostra para o laboratório	Fazer os testes imediatamente após a centrifugação, a qual deve fornecer um plasma pobre em plaquetas (< 10.000/μL)	Amostras lipêmicas dependendo do princípio empregado no coagulômetro

Fonte: Adaptada de Adcock<sup>13</sup> e Comar e colaboradores.<sup>23</sup>



mantidas em temperatura ambiente e em até 24 horas se armazenadas entre 2 e 8 °C.<sup>19,26</sup> **O documento H18-A4 do CLSI<sup>27</sup> descreve detalhadamente os procedimentos para o manuseio e transporte de amostras de diagnóstico.** Na hematologia, **é fundamental** respeitar principalmente as temperaturas de transporte a fim de não alterar os fatores da coagulação e não degenerar as células sanguíneas.<sup>8,27</sup>

## CENTRIFUGAÇÃO

Recomenda-se que o tempo entre a coleta e a centrifugação não ultrapasse uma hora. Como a maioria dos exames de coagulação é realizada em amostras de plasma pobre em plaquetas, com concentração de plaquetas no plasma inferior a 10.000/μL, torna-se necessário verificar periodicamente o funcionamento da centrífuga. Para essa verificação, deve-se selecionar algumas amostras da rotina e fazer a contagem de plaquetas antes e depois da centrifugação. Após a centrifugação, todas as amostras devem ter menos de 10.000 plaquetas/μL, mas caso apresentem resultados superiores, deve-se aumentar o tempo de centrifugação ou ajustar as configurações da centrífuga a fim de se obter plasmas pobres em plaquetas adequados para se realizar os testes de coagulação. O estudo deve ser repetido após ajuste ou redefinição do tempo de centrifugação para garantir a sua efetividade. A velocidade de centrifugação sugerida para gerar plasmas adequados é de 1500g durante 15 minutos ou mais.<sup>24,28</sup>

## VARIÁVEIS ENDÓGENAS

### MEDICAMENTOS E ANALITOS

Vários medicamentos como anti-inflamatórios, anticoagulantes orais, antirretrovirais, entre outros, interferem nos exames hematológicos, e, por isso, o paciente deve ser questionado quanto ao uso de medicamentos eventuais ou crônicos e a forma de administração. O laboratório deve estabelecer um protocolo de questionamentos a ser respondido pelo paciente. O preenchimento correto desse protocolo fica a cargo da recepção do laboratório, a qual deve estar capacitada para essa função. O aumento da concentração de uma substância química pode afetar algumas determinações hematológicas. Assim, níveis de glicose superiores a 600 mg/dL podem levar a um aumento transitório do VCM na medida em que a água entra nos eritrócitos. No

entanto, saídas de água dos eritrócitos junto com a glicose restauram o VCM original. Esse efeito hipoglicêmico transitório pode ser superado por uma microdiluição da amostra de sangue em solução salina e uma espera de 5 minutos até a amostra ser analisada novamente.

Hiperlipidemias, incluindo níveis de triglicerídeos superiores a 1.000 mg/dL podem provocar aumento espúrio da concentração de hemoglobina nos analisadores hematológicos pelo fato de ela ser determinada por espectrofotometria. Esse efeito pode ser superado por meio de centrifugação da amostra, retirada do plasma lipêmico e subsequente ressuspensão do concentrado ou papa de hemácias em igual volume de soro fisiológico ou diluente do equipamento antes da análise. Após essa análise, considera-se apenas o novo valor de hemoglobina e recalcula-se as constantes corpusculares (HCM e CHCM). Quanto aos demais parâmetros, como contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e o volume globular, mantêm-se os valores da primeira análise, com a amostra ainda lipêmica, pelo fato de poderem ser alterados com a manipulação da amostra para a dosagem da hemoglobina corrigida. A seguinte fórmula também pode ser utilizada para a correção da hemoglobina em amostras lipêmicas; contudo, ela só funciona para amostras com VCM dentro dos valores de referência. Da mesma maneira, a hemoglobina corrigida substitui a antiga e recalcula-se as constantes corpusculares (HCM e CHCM):

$$\text{Hemoglobina corrigida} = \frac{\text{VCM (dentro dos valores de referência)} \times \text{RBC}}{2,98 \times 10}$$

VCM = volume corpuscular médio  
RBC = eritrócitos (do inglês *red blood cells*)

A turbidez resultante da precipitação de proteínas monoclonais, vista em pacientes com mieloma ou macroglobulinemia, pode falsamente elevar a concentração de hemoglobina e a contagem de leucócitos e, em alguns casos, com precipitação intensa e com gelificação das amostras, impossibilita totalmente a análise automatizada.

Aglutininas eritrocitárias, hiperglicemia, fragmentação eritrocitária, contagens elevadas de linfócitos, presença acentuada de plaquetas gigantes, agregados plaquetários e microcitose intensa provocam alterações espúrias da amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW, do inglês *red blood cell distribution width*).<sup>29-32</sup>



## ⚡ ANTICORPOS CIRCULANTES

A presença de alguns anticorpos endógenos, que são produzidos pelos pacientes em determinadas épocas e por tempo indeterminado, podem alterar os resultados de testes hematológicos. A presença de anticorpos chamados de anticoagulante lúpico e anticardiolipina alteram o TTPa e outros testes dependentes de fosfolípidios.<sup>6</sup> O EDTA, após quelar o cálcio, pode expor anticorpos endógenos direcionados contra o complexo de glicoproteínas IIb/IIIa das plaquetas, provocando sua aglutinação em um fenômeno *in vitro* chamado de pseudotrombocitopenia, induzido pelo EDTA, e que está presente em cerca de 0,1% da população. Essa reação antígeno anticorpo é acentuada em baixas temperaturas, incluindo a temperatura ambiente, e provoca diminuição espúria da contagem de plaquetas e aumento espúrio da contagem de leucócitos quando os agregados plaquetários são do mesmo tamanho que os leucócitos.<sup>33</sup> Anticorpos IgM dependentes de EDTA provocam leucoaglutinação em temperatura ambiente, a qual é percebida na observação da lâmina e pode provocar diminuição espúria da contagem automatizada de leucócitos.<sup>34</sup> O satelitismo plaquetário é um fenômeno que ocorre *in vitro*, em temperatura ambiente, quando plaquetas circundam os neutrófilos ou são fagocitadas pelos mesmos devido a autoanticorpos IgG dependentes de EDTA, que são direcionados para receptores nas membranas das plaquetas e dos neutrófilos, provocando diminuição espúria da contagem de plaquetas.<sup>35</sup>

Essas situações podem ser minimizadas quando se reanalisa a amostra imediatamente após aquecê-la, por 30 minutos, a 37 °C. Caso não resolva, deve-se levar uma alíquota da amostra em um agitador de vórtex e agitá-la durante 3 minutos em alta velocidade, a fim de romper o complexo antígeno anticorpo. Uma lâmina pós-vórtex deve ser examinada para verificar a eficiência desse procedimento antes de reportar o resultado. Se a contagem de plaquetas ou leucócitos ainda estiver alterada, deve-se solicitar coleta em outro anticoagulante, normalmente o citrato de sódio. Quando se contam plaquetas em amostra coletada em citrato, deve-se corrigir a contagem em função da diluição da amostra, haja vista o citrato ser líquido numa relação 1:9. Para corrigir, basta multiplicar o valor da contagem automatizada de plaquetas por 1,1, que é o fator da diluição. Pode-se, ainda, analisar a amostra imediatamente após a

coleta. Entretanto, não se recomenda coletar amostras de sangue sem anticoagulantes e nem analisá-las imediatamente após a coleta, pois trazem risco de entupimento para o analisador hematológico, comprometendo o bom andamento da rotina.<sup>36,37</sup>

As crioaglutininas são anticorpos completos do tipo IgM e podem aparecer em alguns pacientes com anemia hemolítica autoimune e com pneumonias atípicas, entre outras doenças. Esses anticorpos provocam aglutinação dos eritrócitos em temperaturas abaixo de 37 °C, prejudicando a contagem de eritrócitos e reticulócitos, a determinação do VG e das constantes corpusculares. Geralmente, a contagem de eritrócitos e o VG são falsamente diminuídos enquanto o VCM, HCM e o CHCM são falsamente aumentados. Para contornar essa situação, as amostras devem ser aquecidas, durante 30 minutos, a 37 °C antes das contagens serem realizadas.<sup>38</sup>

Anticorpos EDTA dependentes também podem induzir o aparecimento da pseudo-síndrome das plaquetas cinzentas. Os anticorpos são distintos dos implicados na pseudotrombocitopenia EDTA dependente, os quais induzem a liberação do conteúdo dos grânulos alfa e delta das plaquetas, sem que haja agregação plaquetária. A pseudo-síndrome das plaquetas cinzentas só é induzida pelo EDTA; não ocorre com outros anticoagulantes e não é observada em lâminas confeccionadas com sangue sem anticoagulante. Portanto, cuidados devem ser tomados para não associar a presença de plaquetas cinzentas artefatuais com tendências reais de sangramento.<sup>37</sup>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os procedimentos realizados no laboratório de hematologia devem estar escritos na forma de procedimento operacional padrão e devem explicar claramente como identificar um paciente, coletar e identificar uma amostra, além de como transportá-la e prepará-la para a fase analítica. Os profissionais que executam os procedimentos pré-analíticos devem compreender não só o que os procedimentos são, mas por que eles são importantes para serem seguidos. Os profissionais precisam saber não só o que acontece se as medidas corretas não forem seguidas, mas também quais erros podem ocorrer e que efeito podem ter sobre a amostra e, principalmente, sobre o paciente. Deve-se prover formação contínua para esses pro-



fissionais do laboratório, e suas competências devem ser avaliadas periodicamente.

Tecnologias modernas e sistemas de informação também podem ajudar a reduzir erros pré-analíticos. Já existe o preparo automatizado da bandeja de flebotomia, o qual fornece o conjunto completo dos tubos de sangue de uma determinada requisição, além das etiquetas de códigos de barras para rotulagem em uma bandeja para cada paciente. Coagulômetros automatizados já disponibilizaram aos laboratórios novos meios para a detecção automática dos índices do plasma, incluindo o índice de hemólise, icterícia e lipemia. Esses índices podem ser úteis para monitorar a qualidade do processo de coleta. Por fim, quando uma amostra não pode ser obtida ou analisada, é de responsabilidade do laboratório comunicar o problema para o médico ou paciente, de modo cortês, sucinto e amigável.<sup>39</sup>

## REFERÊNCIAS

1. Lima-Oliveira GS, Barcelos LF, Corrêa JA, Guimarães JC, Neufeld PM, Grinberg I. Gestão da qualidade na fase pré-analítica parte I: análise crítica do CLSI H3-A6. *Rev Bras Anal Clin*. 2011;43(2):85-8.
2. Lima-Oliveira GS, Picheth G, Sumita NM, Scartezini M. Controle de qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(6):441-7.
3. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(6):750-9.
4. Jury C, Nagia Y, Tatsumi N. Collection and handling of blood. In: Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. *Dacie and Lewis practical haematology*. 11th ed. China: Churchill Livingstone Elsevier; 2012.
5. Mullins CA. Specimen collection. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. *Hematology: clinical principles and applications*. 4th ed. St. Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2012.
6. Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(3):429-52.
7. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. *Hematologia laboratorial*. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.
8. Andriolo A, Martins AR, Ballarati CAF, Barbosa IV, Mendes MA, Melo MR, et al. *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso*. 2. ed. Barueri: Manole; 2010.
9. Lippi G, Salvagno G, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. *Clin Lab*. 2006;52(5-6):217-30.
10. McCall RE, Tankersley CM. Phlebotomy and specimen considerations. In: Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
11. Olesinski RL. Specimen collection for hematology and hemostasis. In: Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA, editors. *Clinical hematology: principles, procedures, correlations*. 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays. Approved guideline. 5th ed. Wayne: CLSI; 2008.
13. Adcock DM. Sample collection and processing in hemostasis. In: Marchant-Kottke K, Davis BH, editors. *Laboratory hematology practice*. Singapura: Blackwell; 2012.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved standard. 6th ed. Wayne: CLSI; 2007.
15. Quick AJ, Honorato R, Stefanini M. The value and limitations of the coagulation time in the study of hemorrhagic diseases. *Blood*. 1948;3(10):1120-9.
16. Van Cott EM, Lewandrowski KB, Patel S, Grzybek DY, Patel HS, Fletcher SR, et al. Comparison of glass K3EDTA versus plastic K2EDTA blood-drawing tubes for complete blood counts, reticulocyte counts, and white blood cell differentials. *Lab Hematol*. 2003;9(1):10-4.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Tubes and additives for venous and capillary blood specimen collection. Approved standard. 6th ed. Wayne: CLSI; 2010.
18. Van Assendelft OW, Parvin RM. Specimen collection, handling and storage. In: Lewis SM, Verwilghen RL. *Quality assurance in haematology*. London: WHO; 1988.
19. Van Assendelft OW, Simmons A. Specimen collection, handling, storage and variability. In: Lewis SM, Koepke JA. *Hematology laboratory management and practice*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1995.
20. Dalanhol M, Barros M, Mazuchelli J, Silva PH, Hashimoto Y, Largura A. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(1):16-22.
21. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(3):336-42.
22. World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Reports Series. No 880. Geneva: WHO; 1999.
23. Comar SR, Locatelli GB, Odeli L, Bomfim LK. Avaliação do desempenho analítico do coagulômetro automatizado Sysmex CA-1500: experiência do Hospital de Clínicas da UFPR. *Rev Bras Anal Clin*. 2011;43(3):237-44.
24. Medeiros Jr N, Munhoz MAG. Controle de processo em coagulação. In: Oliveira CA, Mendes ME, organizadores. *Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática*. Rio de Janeiro: ControlLab; 2012. v. 3.
25. Maedel LB, Doig K. Examination of the peripheral blood film and correlation with the complete blood count. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. *Hematology: clinical principles and applications*. 4th ed. St. Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2012.
26. Favaloro EJ, Adcock DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med*. 2012;43(2):1-10.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the handling and processing of blood specimens for



- common laboratory tests. Approved guideline. 4th ed. Wayne: CLSI; 2010.
28. Lawrence JB. Preanalytical variables in the coagulation laboratory. *Lab Med*. 2003;34(1):49-57.
29. Bessman JD. Red cells. In: Bessman JD. Automated blood counts and differentials: a practical guide. Baltimore: The Johns Hopkins University; 1986.
30. Cornbleet J. Spurious results from automated hematology cell counters. *Lab Med*. 1983;14:509-14.
31. Park KI, Kim KY. Clinical evaluation of red cell volume distribution width (RDW). *Yonsei Med J*. 1987;28(4):282-90.
32. Flynn MM, Reppun TS, Bhagavan NV. Limitations of red blood cell distribution width (RDW) in evaluation of microcytosis. *Am J Clin Pathol*. 1986;85(4):445-9.
33. Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(8):1281-5.
34. Yang D, Guo X, Chen Y, Xu G. Leukocyte aggregation in vitro as a cause of pseudoleukopenia. *Lab Med*. 2008;39(2):89-91.
35. Criswell KA, Breider MA, Bleavins MR. EDTA-Dependent platelet phagocytosis. A cytochemical, ultrastructural, and functional characterization. *Am J Clin Pathol*. 2001;115(3):376-84.
36. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Pseudotrombocytopenia. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(5):321-4.
37. Mues G, Wians Jr FH, Kroft SH. EDTA-Induced pseudo-gray platelet syndrome. *Lab Med*. 2001;32(7):361-4.
38. Stamminger G, Beier L. Use of the XE-2100 in a patient with cold auto-immune hemolytic anemia. *Sysmex J Int*. 2000;10(1):3-12.
39. Hammerling JA. A review of medical errors in laboratory diagnostics and where we are today. *Lab Med*. 2012;43(2):41-4.



## FASE ANALÍTICA

### ANALISADORES HEMATOLÓGICOS E NOVOS PARÂMETROS DERIVADOS DA AUTOMAÇÃO

2



#### BREVE HISTÓRIA

Há muito tempo, a inspeção do sangue humano tem sido uma ferramenta básica de diagnóstico. Ao longo dos séculos, as invenções relacionadas à análise celular do sangue foram caracterizadas por observações cuidadosas, atenção meticulosa aos detalhes e aplicação de técnicas avançadas para sua época. A **Tabela 2.1** mostra os principais acontecimentos relativos à história e ao desenvolvimento da tecnologia aplicada para identificar e quantificar os elementos do sangue.

#### SISTEMAS AUTOMATIZADOS EM HEMATOLOGIA

A automação no setor de hematologia vem crescendo substancialmente nos últimos anos, e os fabricantes oferecem cada vez mais inovações em seus analisadores hematológicos com o intuito de diminuir os custos, a intervenção humana e o tempo de liberação dos resultados. Além disso, os resultados são mais precisos que os dos métodos manuais e, desde a década de 1980, os analisadores hematológicos automatizados vêm substituindo totalmente os métodos manuais de contagem, com exceção da contagem diferencial de leucócitos e da contagem de plaquetas por microscopia de contraste de fase, em certas situações.

Em menos de um minuto, os contadores fornecem vários parâmetros de série branca, vermelha e plaquetas, incluindo a contagem diferencial de leucócitos em três, cinco ou mais partes. Utilizam pequenos volumes de amostra, geralmente abaixo de 150  $\mu\text{L}$ , além de conferirem mais eficiência no manejo da rotina laboratorial, aumentando a produção e a qualidade dos exames e possibilitando que mais diagnósticos e tratamentos sejam realizados em tempo adequado.<sup>12,33</sup>

Dependendo do instrumento, ainda pode ser possível analisar células de líquidos cavitários, líquido sinovial, líquido cefalorraquidiano e células da medula óssea. Os instrumentos se baseiam em várias tecnologias de medição utilizadas de diferentes maneiras, sendo as principais delas a medida da impedância, em baixas e altas frequências, a medida do desvio da luz, a qual pode ser incidida frontal e lateralmente e, ainda, a emissão de fluorescência e reações de absorção da luz precedida de reações citotóxicas.

#### TECNOLOGIA DE DETECÇÃO E CONTAGEM DE CÉLULAS DO SANGUE

Todos os analisadores hematológicos notam a presença de uma célula quando a mesma provoca uma alteração durante a passagem através de um campo eletromagnético. Contudo, diferentes tecnologias são empregadas para criar o campo eletromagnético e, como resultado, diferentes propriedades biofísicas das células são responsáveis pela criação do sinal a ser detectado. Em relação à frequência de oscilação do campo, constatou-se que sinais de baixa frequência (corrente direta) definem o tamanho da célula, enquanto sinais elétricos de alta frequência (radiofrequência) são influenciados pela estrutura interna das células. Quando a



TABELA 2.1 Principais acontecimentos relativos à história e ao desenvolvimento da tecnologia aplicada para identificar e quantificar os elementos do sangue	
ANO	ACONTECIMENTO
1590	Hans Janssen e Zacharias Janssen inventaram o microscópio
1674	Antonie van Leeuwenhoek observou as células do sangue e enumerou eritrócitos
1718	Jurin estabeleceu o diâmetro exato do eritrócito humano
1842	Alfred Donné descreveu as plaquetas como o terceiro elemento do sangue
1846	Gulliver fez a primeira diferenciação entre linfócitos e granulócitos com base no tamanho
1851	Karl Vierordt publicou um procedimento para contar células com o auxílio de um capilar e microscópio que requeria pelo menos 3 h para terminar
1854-1855	Introdução da câmara de contagem ou hemocitômetro por Welker e Cramer
1865	Wilhelm H. Erb descreveu os reticulócitos como formas precursoras dos eritrócitos
1874	Louis-Charles Malassez pela primeira vez enumerou leucócitos em um hemocitômetro
1875	As plaquetas foram primeiramente enumeradas por Hayem & Nacket
1878	Gowers realizou as primeiras tentativas para se determinar a concentração de hemoglobina no sangue
1879-1880	Ehrlich diferenciou leucócitos com o uso de corantes derivados da anilina
1881	Hemocitômetro de Lyon e Thoma
1882	O patologista italiano Giulio Bizzozero descreveu as plaquetas como <i>petites plaques</i> envolvidas na coagulação sanguínea <i>in vivo</i>
1891	O médico russo Romanowsky desenvolveu uma coloração hematológica que utilizava corantes ácidos e básicos (azul de metileno e eosina). Tal fato abriu um novo horizonte para o exame morfológico das células sanguíneas, possibilitando o estabelecimento de relações entre as observações microscópicas e a acepção clínica
1895	Sahli desenvolveu um método para dosar hemoglobina, o qual combinava a amostra com HCl para formar hematina
1899	Jenner desenvolveu uma coloração hematológica derivada de Romanowsky
1901	Leishman desenvolveu uma coloração hematológica derivada de Romanowsky
1902	May & Grunwald e Wright desenvolveram colorações hematológicas derivadas de Romanowsky
1905	Hemocitômetro de Bürker
1907	Hemocitômetro de Thoma
1920	Stadie introduziu o método da ciano-meta-hemoglobina, o qual ainda é o método de referência do International Council for Standardization in Haematology (ICSH)
1929	Wintrobe descreve a técnica de centrifugação para obtenção do hematócrito e as constantes corpusculares: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)
1930	Heilmeyer publicou descrição da morfologia dos reticulócitos em diferentes estágios de maturação
1934	Moldavan contou células do sangue por método fotoelétrico
1934	Wintrobe publicou uma classificação das anemias baseada na concentração de hemoglobina e no volume dos eritrócitos
Década de 1940	A utilidade clínica do hemograma já tinha sido estabelecida, e esse teste passou a ser solicitado rotineiramente para um grande número de pacientes com o propósito de diagnosticar doenças e fazer acompanhamento de terapias específicas
1942	Drabkin desenvolveu o método da ciano-meta-hemoglobina para a dosagem de hemoglobina
1949	Brecher introduziu a contagem manual de reticulócitos utilizando o corante supravital azul de metileno novo para corar o conteúdo de RNA dos reticulócitos
1953	Crosland-Taylor descreveram o método do fluxo laminar ( <i>sheat flow</i> ), o qual ajudou a melhorar a precisão das contagens por diminuir o fenômeno de coincidência de células no orifício de contagem
1956	Wallace Henry Coulter desenvolveu o método da impedância para contar células sanguíneas e lançou o primeiro analisador hematológico chamado Coulter Counter® Modelo A
1957-1958	Lançamento do analisador Micro Cell Counter CC-1001, primeiro analisador hematológico da Sysmex®

(continua)



**TABELA 2.1** Principais acontecimentos relativos à história e ao desenvolvimento da tecnologia aplicada para identificar e quantificar os elementos do sangue (*continuação*)

ANO	ACONTECIMENTO
1963	Fundação do ICSH
1965	A Technicon® introduz o analisador SMA 4A-7A, primeiro instrumento utilizado para automatizar a contagem de mais de um elemento do sangue em uma única amostra
1968	O Coulter Counter® Modelo S Plus se tornou o primeiro analisador hematológico amplamente difundido
1969	Reinhard Thom e colaboradores inventaram o método de focalização hidrodinâmica aplicado à detecção da impedância elétrica. Esse método melhorou a exatidão e precisão das contagens e a resolução das curvas de distribuição de volumes celulares
1970	O analisador Hemalog-8 da Technicon® incorpora, pela primeira vez, a contagem de plaquetas aos demais parâmetros fornecidos
1974	Lançamento do analisador de diferencial de leucócitos Hemalog-D da Technicon®. Possuía três canais e fornecia a diferenrencial de leucócitos em cinco partes
1980	O analisador Coulter Counter® Modelo S Plus II fornece, pela primeira vez, o RDW, o volume plaquetário médio (VPM) e a contagem relativa e absoluta de linfócitos
1981	O analisador Technicon® H6000 é o primeiro a fornecer a contagem diferencial de leucócitos em cinco partes, juntamente com os demais parâmetros de série vermelha e plaquetas, tornando-se o primeiro analisador hematológico multiparamétrico
1983	O analisador Coulter Counter® Modelo S Plus IV fornece, pela primeira vez, o PDW (do inglês <i>platelet distribution width</i> ), análogo ao RDW
1989	Automação completa da contagem de reticulócitos com o uso do analisador dedicado Sysmex® R-1000

**Fonte:** Adaptada de Bain,<sup>1</sup> Bain e colaboradores,<sup>2</sup> Brown,<sup>3</sup> Cartwright,<sup>4</sup> Coulter,<sup>5</sup> Crosland-Taylor,<sup>6</sup> England,<sup>7</sup> Fujimoto,<sup>8</sup> Greer e colaboradores,<sup>9</sup> Groner e Kanter,<sup>10</sup> Groner e Simson,<sup>11</sup> Kjeldsberg e Knight,<sup>12</sup> Lichtman e colaboradores,<sup>13</sup> Okada,<sup>14</sup> e Rowan e England.<sup>15</sup>

detecção das células é feita em um campo elétrico estático, como o inventado por Coulter em 1956, tradicionalmente denomina-se impedância elétrica, enquanto um campo de frequência óptica é denominado de método óptico ou de dispersão da luz.<sup>11-16</sup>

:: MÉTODO ELÉTRICO

Impedância

Em 1948, o engenheiro americano Wallace Henry Coulter inventou o princípio da impedância.<sup>5</sup> Originalmente desenvolvido para contar o número de partículas em fluidos não biológicos, em 1956, esse método foi adaptado para contar células sanguíneas em virtude da crescente demanda por exames de sangue. O primeiro contador de células sanguíneas que utilizou esse princípio foi o Coulter Counter® Modelo A (**Figura 2.1**).

O método da impedância tornou possível aumentar o número de contagens de células em 100 vezes quando comparado aos métodos manuais utilizando microscópio óptico. Também possibilitou diminuir o tempo de enumeração de células de 30 minutos para 15 segundos, além de reduzir o erro em um fator de 10 vezes.<sup>5</sup>



**FIGURA 2.1** Coulter Counter® Modelo A.

**Fonte:** Quintana.<sup>17</sup>

O método da impedância elétrica baseia-se na determinação de mudanças na condutividade de um meio condutor, como soro fisiológico, durante a passagem das células sanguíneas por uma pequena abertura entre dois eletrodos. As células são consideradas como partículas não condutoras de eletricidade e provocam diminuição da condutividade do meio e aumento da resistividade (impedância). A pequena abertura por onde as células passam possui diâmetro e comprimento predefinido de acordo com o tipo celular que se deseja



contar, e a região ao redor desse orifício chama-se zona de detecção. Aplicando a lei de Ohm, vemos que a impedância é obtida da seguinte maneira:

$$I = \frac{V}{C} = r(l/a)$$

I é a impedância da abertura  
V é a voltagem aplicada entre os eletrodos  
C é a corrente elétrica  
r é a resistividade da solução salina  
l é o comprimento da abertura  
a é a área do corte transversal da abertura

Mudanças na impedância são proporcionais aos volumes das células, fato que possibilita contá-las e separá-las por tamanho. Quando as células atravessam a zona de detecção, uma a uma, em fila simples, pode-se determinar com exatidão a sua contagem. Contudo, quando duas ou mais células passam ao mesmo tempo, são fornecidas contagens inexatas. A magnitude desse erro de coincidência aumenta simultaneamente com a concentração da suspensão de células e, para eliminar o erro, estabeleceu-se o uso de diluições apropriadas das amostras e uma fórmula de correção da coincidência que é integrada ao sistema de informação dos analisadores (Figura 2.2).

Alternativamente, foram desenvolvidos métodos que produzem um fluxo controlado de amostra pela abertura, induzindo as células a passarem no centro da zona de detecção, em fila simples, para evitar distorções. O fluxo laminar (*sheat flow*)<sup>6</sup> e a focalização hidrodinâmica<sup>19</sup> são alguns desses métodos e têm sido implantados em vários analisadores hematológicos.

No *sheat flow*, as células são forçadas a passar pela abertura em um fino fio de fluido. Esse procedimento reduz as chances de ocorrer sobreposição de células sanguíneas na região de detecção. Na focalização hidrodinâmica, um fluxo constante de diluente passa pelo orifício de contagem, e a suspensão de células é injetada nessa massa líquida em movimento, até formar uma corrente fina de células, as quais passam praticamente uma a uma pela abertura. Após a passagem pela abertura, a amostra diluída é envolvida por outra corrente de fluxo do mesmo diluente e então é removida. Isso impede que os eritrócitos e as plaquetas, nessa área, recirculem, impedindo a geração de falsos pulsos e, consequentemente, de contagens espúrias (Figura 2.3).

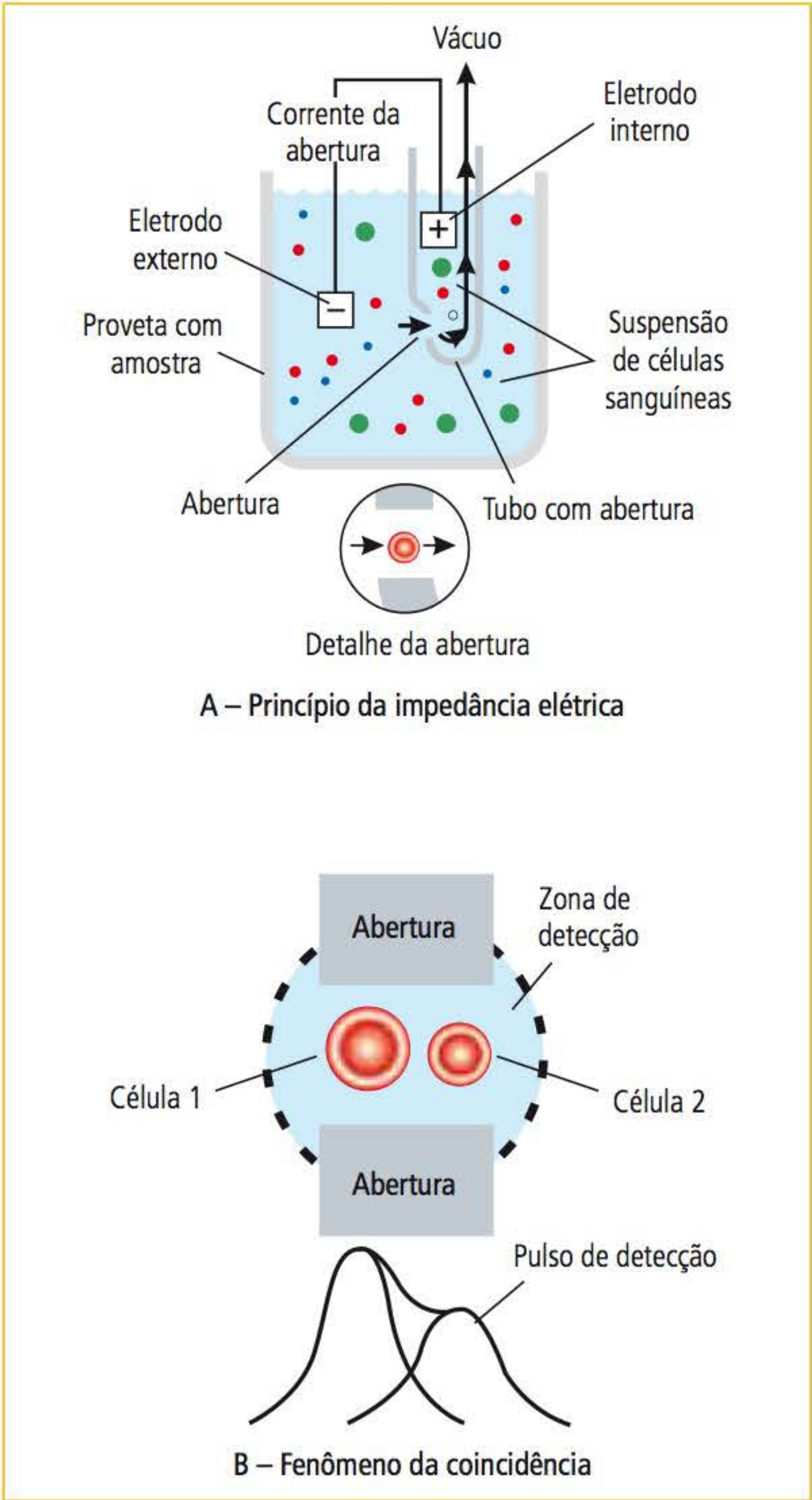


FIGURA 2.2 Princípio da impedância elétrica e fenômeno de coincidência.

Fonte: Adaptada de Tatsumi e colaboradores.<sup>18</sup>

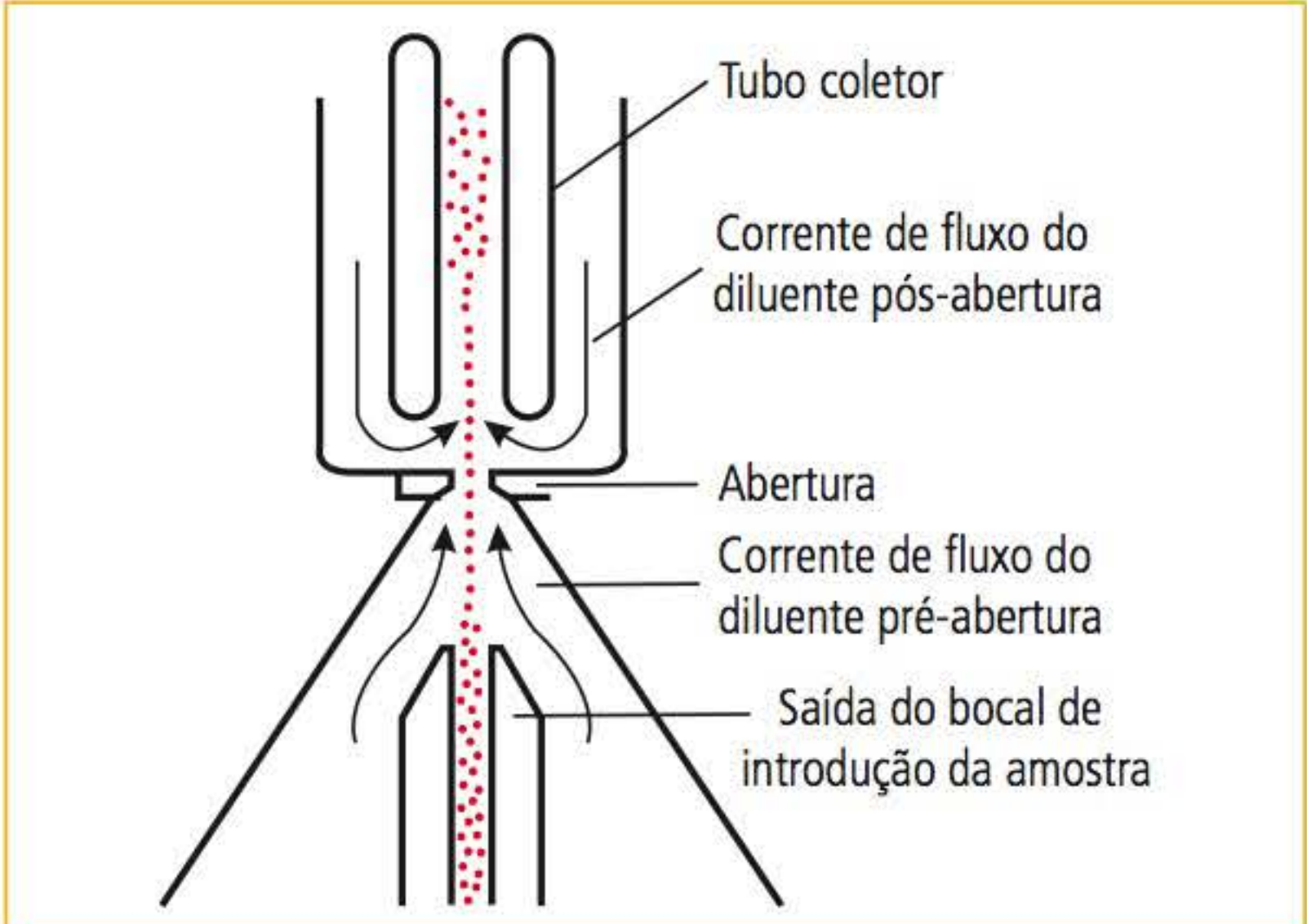


FIGURA 2.3 Focalização hidrodinâmica.

Fonte: Adaptada de Tatsumi e colaboradores.<sup>18</sup>



Radiofrequência

Enquanto o princípio da impedância utiliza corrente direta de baixa voltagem para determinar o volume das células, o método da radiofrequência utiliza corrente eletromagnética de alta voltagem para determinar o volume e a complexidade do núcleo das células. A combinação desses dois princípios pode ser utilizada para identificar tipos celulares e para otimizar a sensibilidade de alertas morfológicos (Figura 2.4).

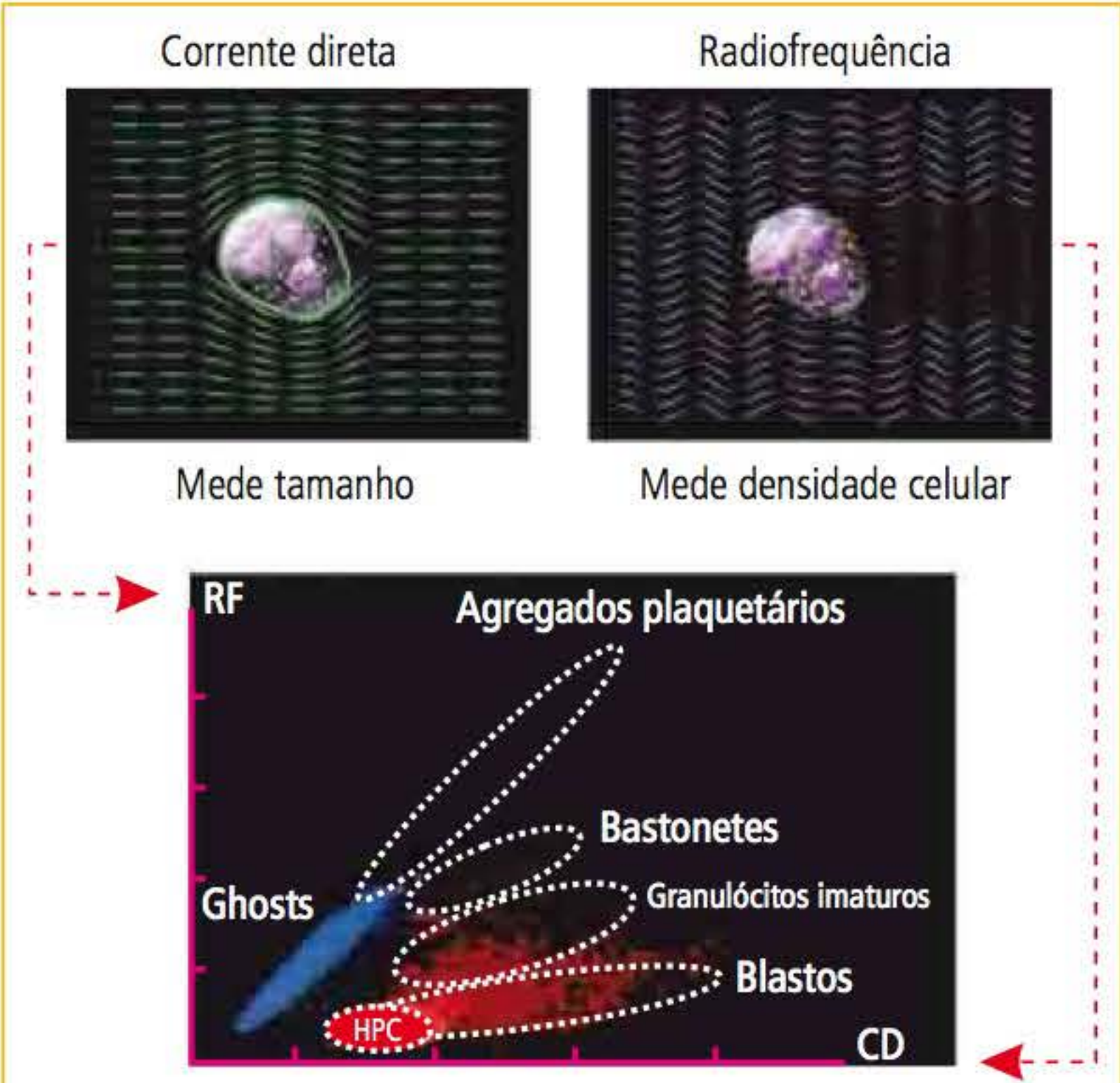


FIGURA 2.4 Aplicações conjuntas da impedância e radiofrequência.

RF, radiofrequência; CD, corrente direta; HPC, células progenitoras hematopoiéticas.

MÉTODO ÓPTICO

Dispersão da luz

O método óptico pode ser utilizado como metodologia primária ou em combinação com o método da impedância para analisar eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Há muitos detalhes exclusivos para os analisadores atuais; contudo, os princípios básicos para a análise por citometria de fluxo são semelhantes. Nos sistemas ópticos, um fluxo centralizado de amostra, geralmente obtido por focalização hidrodinâmica, é direcionado por meio de uma câmara de fluxo por onde passa uma fonte de *laser* monocromática em fase. Durante esse trajeto, as células provocam alterações no feixe de luz, e o número de vezes que a luz dispersa incide sobre o fotodetector possibilita a enumeração das células (Figura 2.5).

A interação das células com o feixe de luz provoca a sua dispersão em várias direções, assim como fenômenos de absorção, difração, refração e reflexão, os quais podem ser acentuados *in vitro* por meio de reação citoquímicas com fluorocromos, enzimas como a peroxidase, entre outras técnicas especializadas (Figura 2.6). Com a ajuda de um computador, as diferentes interações entre as células e o *laser* podem ser esboçadas em gráficos para gerar citogramas e histogramas com informações qualitativas e quantitativas.

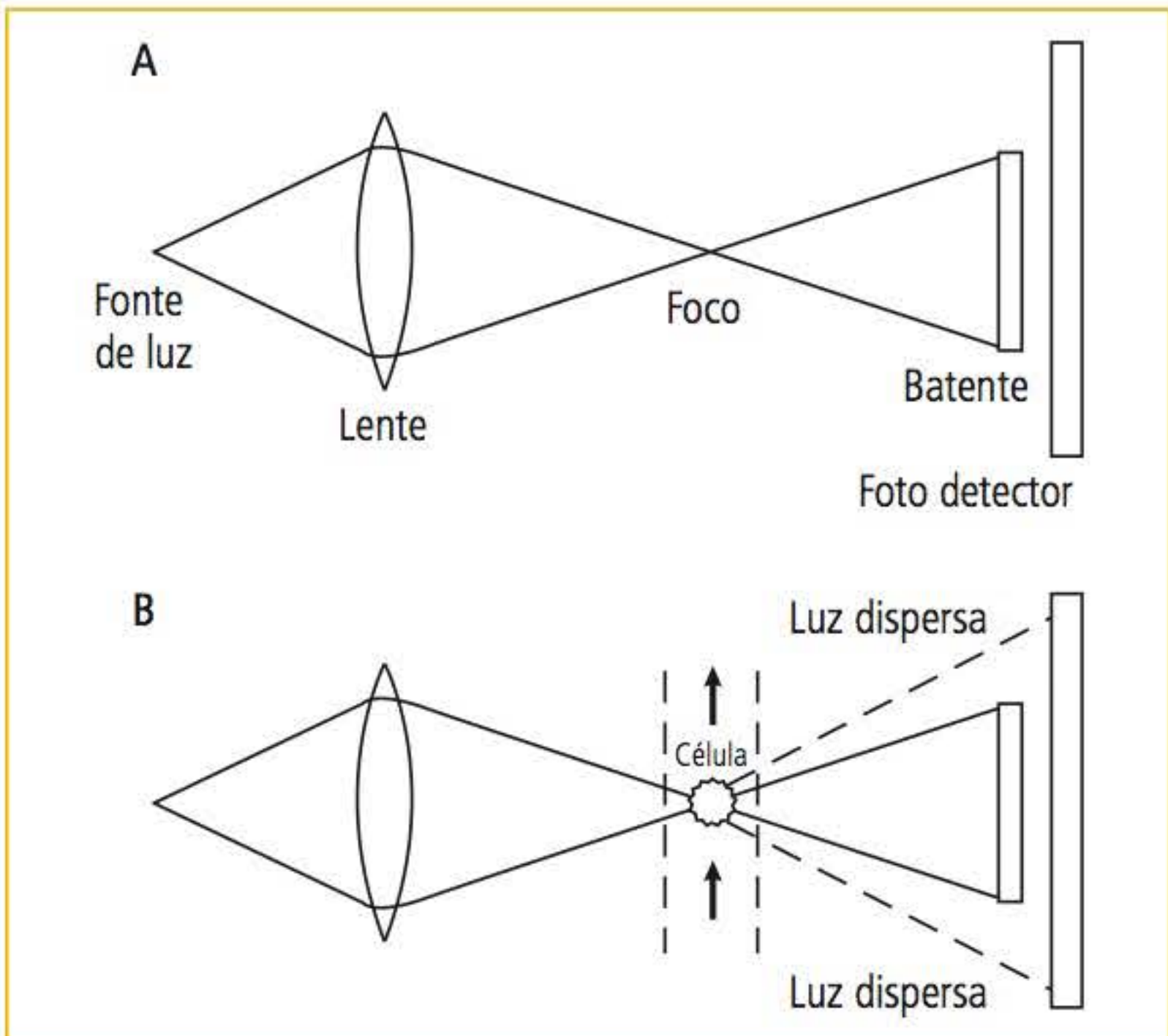


FIGURA 2.5 Disposição óptica de um sistema de dispersão de luz. O batente impede que a luz atinja o foto detector (A), a menos que uma célula disperse a luz (B).

Fonte: Adaptada de England.<sup>7</sup>

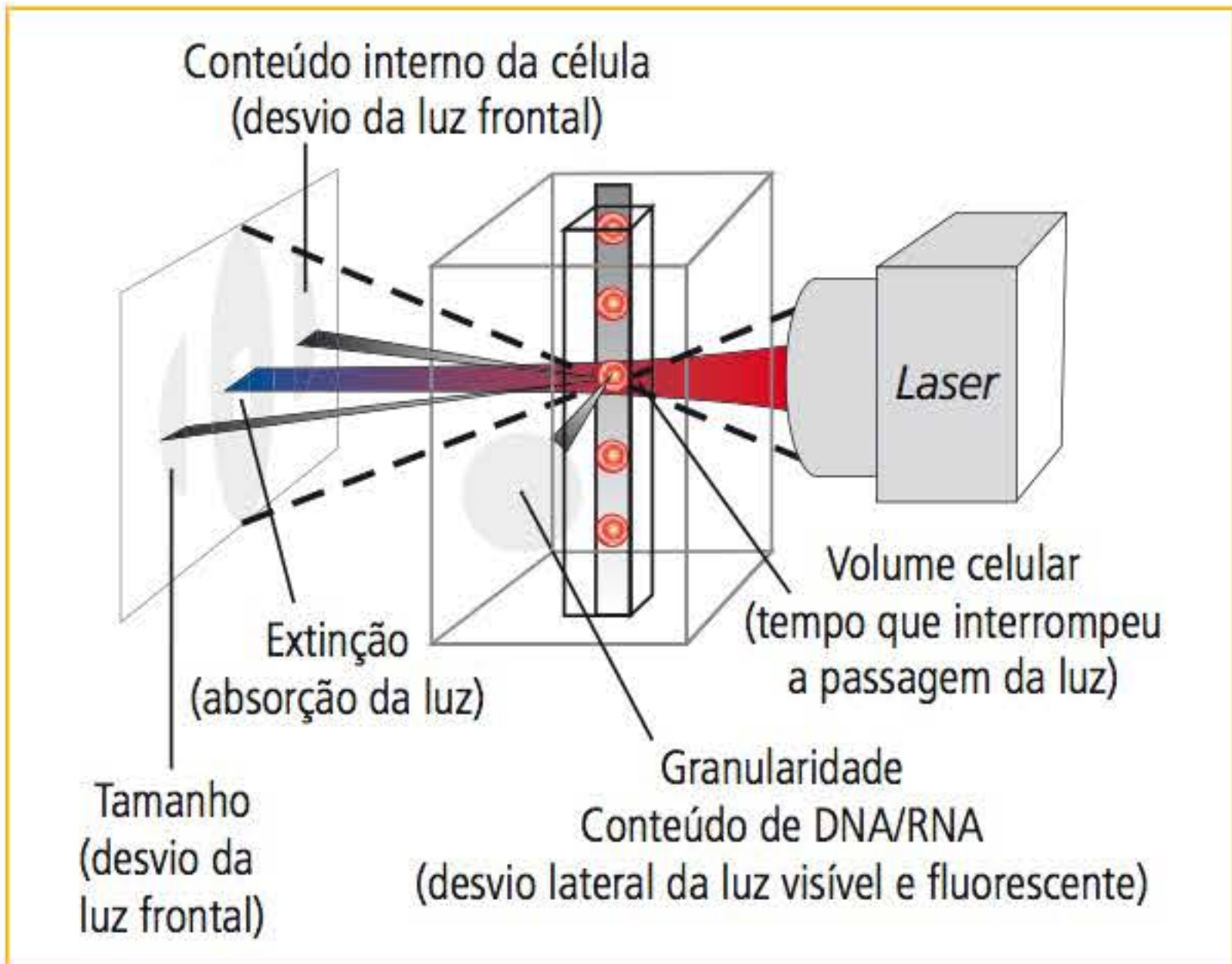


FIGURA 2.6 Princípios de interação com a luz em analisadores hematológicos.

Fonte: Adaptada de DeNicola.<sup>20</sup>



IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

Nos analisadores hematológicos, a classificação das células depende de uma discriminação, com base na forma e na amplitude dos sinais gerados em decorrência das interações físicas das células que ocorrem na região de detecção. Na identificação das subclasses de leucócitos, os principais fatores utilizados pelos analisadores hematológicos modernos são o tamanho e a estrutura interna das células. Após a lise dos eritrócitos, os linfócitos são identificados pelo seu tamanho, enquanto os granulócitos são identificados pela sua estrutura celular interna. Em alguns casos, a constituição interna pode ser acentuada por colorações específicas. Existe um dilema entre a complexidade dos

métodos para tratar e modificar as células sanguíneas e a complexidade da tecnologia de detecção. Quanto mais canais e reagentes são utilizados para identificação das células, menos complexo é o sistema; contudo, os analisadores se tornam menos compactos e exigem vários reagentes. Por outro lado, quanto menos canais e reagentes são utilizados, mais complexo é o sistema, o que implica elevados custos de pesquisas para o seu desenvolvimento. A **Tabela 2.2** mostra, resumidamente, informações técnicas importantes sobre os principais analisadores hematológicos comercializados no Brasil.

Os resultados fornecidos pelos analisadores hematológicos podem ser reportados para o laboratório por meio de contagens numéricas, histogramas e citogramas (**Figura 2.7**). Os resultados

TABELA 2.2 Informações técnicas e tecnologia empregada nos principais analisadores hematológicos comercializados no Brasil

	BECKMAN COULTER®	SYSMEX®	SYSMEX®	ABBOTT® DIAGNOSTICS	SIEMENS® DIAGNOSTICS	HORIBA MEDICAL®	MINDRAY®
Origem	Hialeah, Flórida – EUA	Kobe – Japão	Kobe – Japão	Abbott® Park, Illinois – EUA	Tarrytown, Nova Iorque – EUA	Montpellier – França	Shenzhen – China
Analisador hematológico	Coulter LH 780	XE-5000	Série XN	Cell-Dyn- -Sapphire	Advia 2120i	Pentra DX 120	BC 6800
Capacidade de processamento (testes/hora)	110	150	100-300	100	120	120	125
Leucócitos	Impedância	Impedância	Óptico fluorescente	Óptico	Óptico	Impedância	Impedância
Eritrócitos	Impedância	Impedância	Impedância	Óptico e impedância	Óptico	Impedância	Impedância
Hemoglobina	Ciano-meta- -hemoglobina modificado	Livre de cianeto com lauril sulfato de sódio	Livre de cianeto com lauril sulfato de sódio	Livre de cianeto com imidazol	Ciano-meta- -hemoglobina ou livre de cianeto com óxido de dimetil lauril amina e óptico	Ciano-meta- -hemoglobina ou livre de cianeto por meio de espectrofoto- metria de compostos de oxidação do ferro do grupamento heme	Ciano-meta- -hemoglobina
Volume Globular	(Eritrócitos × VCM)/10	Medição direta pela soma dos pulsos de RBC	Medição direta pela soma dos pulsos de RBC	(Eritrócitos × VCM)/10	(Eritrócitos × VCM)/10	(Eritrócitos × VCM)/10	(Eritrócitos × VCM)/10
VCM	Média do volume dos eritrócitos obtida do histograma de distribuição	(Volume globular/ eritrócitos) × 10	(Volume globular/ eritrócitos) × 10	Média do volume dos eritrócitos obtida do histograma de distribuição	Média do volume dos eritrócitos obtida do histograma de distribuição	Média do volume dos eritrócitos obtida do histograma de distribuição	Média do volume dos eritrócitos obtida do histograma de distribuição
HCM	(Hemoglobina/ eritrócitos) × 10	(Hemoglobina/ eritrócitos) × 10	(Hemoglobina/ eritrócitos) × 10	(Hemoglobina/ eritrócitos) × 10	(Hemoglobina/ eritrócitos) × 10	(Hemoglobina/ eritrócitos) × 10	(Hemoglobina/ eritrócitos) × 10

(continua)



**TABELA 2.2** Informações técnicas e tecnologia empregada nos principais analisadores hematológicos comercializados no Brasil (continuação)

	BECKMAN COULTER®	SYSMEX®	SYSMEX®	ABBOTT® DIAGNOSTICS	SIEMENS® DIAGNOSTICS	HORIBA MEDICAL®	MINDRAY®
CHCM	(Hemoglobina/ volume globular) × 100	(Hemoglobina/ volume globular) × 100	(Hemoglobina/ volume globular) × 100	(Hemoglobina/ volume globular) × 100	(Hemoglobina/ volume globular) × 100	(Hemoglobina/ volume globular) × 100	(Hemoglobina/ volume globular) × 100
RDW	Coeficiente de variação e desvio-padrão do histograma de eritrócitos	Coeficiente de variação e desvio-padrão do histograma de eritrócitos	Coeficiente de variação e desvio-padrão do histograma de eritrócitos	Coeficiente de variação do histograma de eritrócitos	Coeficiente de variação do histograma de eritrócitos	Coeficiente de variação do histograma de eritrócitos	Coeficiente de variação e desvio-padrão do histograma de eritrócitos
Plaquetas	Impedância	Impedância e óptico	Impedância e óptico	Impedância, óptico e imunológico com CD61	Óptico	Impedância	Impedância e óptico
VPM	Média do volume das plaquetas obtida do histograma de distribuição	(Plaquetócrito/ plaquetas × 10 <sup>3</sup> /μL) × 10.000	(Plaquetócrito/ plaquetas × 10 <sup>3</sup> /μL) × 10.000	Média do volume das plaquetas obtida do histograma de distribuição	Média do volume das plaquetas obtida do histograma de distribuição	Média do volume das plaquetas obtida do histograma de distribuição	Média do volume das plaquetas obtida do histograma de distribuição
Reticulócitos	Coloração supravital com azul de metileno novo e detecção do volume, condutividade e dispersão da luz (Tecnologia VCS)	Coloração supravital com polimetina e detecção óptica da fluorescência	Coloração supravital com corante de RNA e detecção óptica da fluorescência	Coloração com cianina (Sybr II) e detecção óptica da dispersão da luz e da fluorescência	Coloração supravital com Oxazina 750 e detecção óptica da dispersão da luz e da absorbância	Coloração com laranja de Thiazol e detecção óptica da fluorescência e por impedância	Coloração supravital com corante fluorescente patenteado e detecção óptica da fluorescência
Neutrófilos	VCS	Método óptico e coloração fluorescente	Possui um único canal para a diferencial em 5 partes. Neste mesmo canal também há eritroblastos <sup>6</sup>	Detecção óptica da fluorescência e da dispersão da luz polarizada e despolarizada em múltiplos ângulos	Coloração pela peroxidase + método óptico	Impedância + citoquímica + método óptico	Método óptico e coloração fluorescente
Linfócitos							
Monócitos							
Eosinófilos							
Basófilos		Lise diferencial + método óptico	Método óptico e coloração fluorescente		Lise diferencial + método óptico	Lise diferencial + impedância	Lise diferencial + método óptico

VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW, *red cell distribution width* (índice de distribuição dos volumes eritrocitários); VPM, volume plaquetário médio; VCS, *volume, conductivity, scatter* (volume, condutividade e dispersão da luz).

Fonte: Comar e Pasquini.<sup>16</sup>

numéricos são apresentados na forma de números simples, os quais representam a concentração celular em número por unidade de volume. No caso das subclasses de leucócitos, a concentração pode também ser representada como uma porcentagem da subclasse em questão com relação ao total de leucócitos. Os histogramas são exibidos graficamente, ilustrando, por meio de uma distribuição de frequência, a concentração de células em função da distribuição do tamanho das mesmas. Nos casos de contagem de células com método óptico,

em que um detector é usado para determinar a luz dispersa de cada célula e o outro para determinar a luz absorvida, os dois sinais podem ser utilizados para gerar um gráfico chamado citograma. Nesse tipo de gráfico, cada célula é um ponto no gráfico, cuja distância do ponto de origem é representada pela amplitude do sinal em cada um dos dois canais de detecção.

Os Quadros 2.1 e 2.2 apresentam informações sobre a determinação da concentração de hemoglobina e do volume globular.



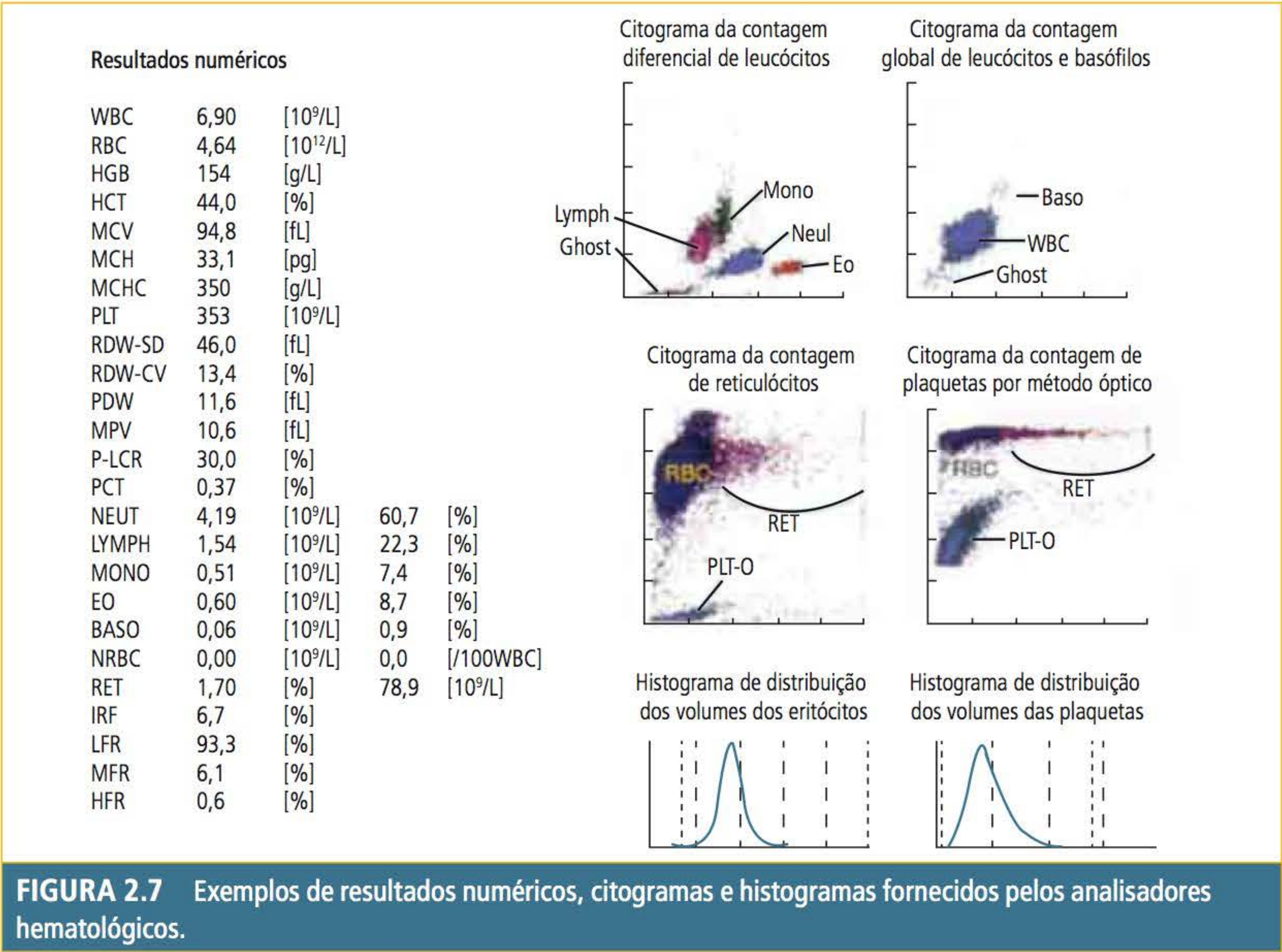


FIGURA 2.7 Exemplos de resultados numéricos, citogramas e histogramas fornecidos pelos analisadores hematológicos.

Fonte: Comar e Pasquini.<sup>16</sup>

QUADRO 2.1 Determinação da concentração de hemoglobina

Muitos analisadores hematológicos ainda determinam a concentração de hemoglobina por meio de uma modificação do método manual da ciano-meta-hemoglobina. Entretanto, muitos fabricantes de analisadores automatizados estão substituindo esse método por outros que possam reduzir possíveis danos ambientais causados pelo cianeto, particularmente no que diz respeito ao tratamento dos grandes volumes de resíduos gerados na rotina laboratorial. Nesses novos métodos, o cianeto pode ser substituído por lauril sulfato de sódio, imidazol, dodecil sulfato de sódio e óxido de dimetil lauril amina, os quais geram novos derivados estáveis da hemoglobina, que também podem ser mensurados espectrofotometricamente.

Fonte: Comar e Pasquini.<sup>16</sup>

QUADRO 2.2 Determinação do volume globular

A maioria dos analisadores hematológicos determina o volume corpuscular médio dos eritrócitos e, a partir dele e da contagem de eritrócitos, o volume globular. Outros analisadores determinam o volume globular diretamente pelo método da detecção dos pulsos gerados para cada eritrócito que passa pela zona de detecção. Nesse método, para determinação do volume globular, somam-se os volumes de todas as células que passam pela zona de detecção, considerando a diluição da amostra e o volume injetado durante um período de tempo determinado. Esse método, segundo o fabricante, possui elevada correlação com o método de referência para determinação do micro-hematócrito conforme documento H7-A3 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). A diferença básica entre volume globular e hematócrito é que o último possui uma pequena quantidade de plasma aprisionado de cerca de 1 a 2% do total.

Fonte: Comar e Pasquini.<sup>16</sup>

ALERTAS SUSPEITOS

Apesar dos grandes avanços observados nos analisadores hematológicos, ainda existem problemas associados com amostras de sangue anormais. Pode-se facilmente compreender a dificuldade que um analisador encontra ao avaliar células anor-

mais, incluindo blastos, granulócitos imaturos, linfócitos atípicos, leucócitos com inclusões citoplasmáticas e, até mesmo, amostras com hemoparasitas. De um modo geral, os contadores são projetados para reconhecer células normais e, quando há um número significativo de células anormais, com alterações na forma e no tamanho nuclear e



celular, possíveis problemas de identificação das células serão encontrados. Algumas limitações dos analisadores são substituídas por alertas suspeitos ou *flags*, que indicam dificuldades na identificação das células. Tais alertas sugerem a presença de determinados tipos celulares diferentes dos normais. Portanto, é um resultado qualitativo, que implica na necessidade de verificação, geralmente pela avaliação microscópica da lâmina de sangue periférico. Esses *flags* devem ser respeitados, e as recomendações do fabricante devem ser seguidas para garantir a qualidade dos resultados.

O desejo de todos os fabricantes de analisadores hematológicos é aumentar a especificidade dos alertas suspeitos sem perder a sensibilidade. Contudo, na prática, muitos casos de falsos positivos são observados, os quais apresentam o *flag*, mas não a alteração morfológica na lâmina. Os analisadores são configurados dessa maneira, de modo

a fornecer mais segurança na liberação dos resultados, mesmo à custa de revisões desnecessárias de lâminas de hemogramas. É preferível trabalhar com uma pequena quantidade de resultados falsos positivos, que impactam apenas na rotina do laboratório, do que trabalhar com elevada taxa de falsos negativos, que podem causar danos aos pacientes devido à omissão de informações relevantes para o diagnóstico e acompanhamento. Mesmo se um alerta demonstrar boa especificidade, não há garantias de que as lâminas não revisadas realmente não contenham alterações morfológicas relevantes. Dessa forma, os alertas morfológicos devem ser utilizados em conjunto com os critérios de revisão e liberação de resultados de hemogramas automatizados (Tabela 3.28 do Capítulo 3), a fim de se obter mais confiança na liberação dos resultados.<sup>21-24</sup> A Figura 2.8 mostra um exemplo de como os *flags* são gerados.

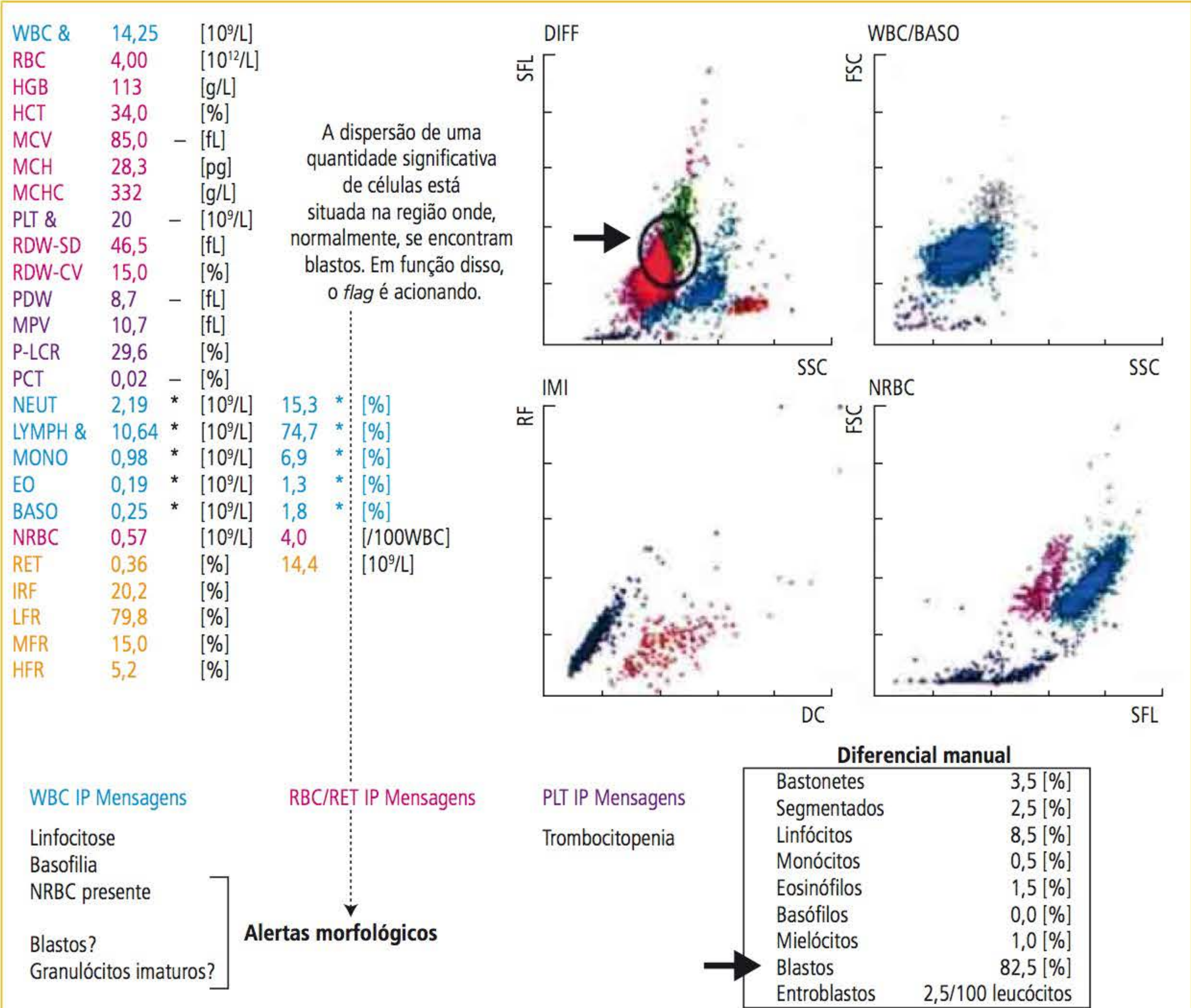


FIGURA 2.8 Exemplo de geração de alertas (*flags*) suspeitos.



SITUAÇÕES QUE INTERFEREM NAS ANÁLISES AUTOMATIZADAS

A **Tabela 2.3** resume várias situações que podem provocar interferência na maioria dos analisadores hematológicos e fornece sugestões para correção dos resultados.

CONTAGEM DIFERENCIAL ESTENDIDA

A contagem diferencial estendida é a contagem de outros tipos celulares além das cinco populações de leucócitos normalmente presentes no sangue periférico e é oferecida, geralmente, pelos analisadores hematológicos mais modernos de cada

TABELA 2.3 Condições que causam interferência na maioria dos analisadores				
CONDIÇÃO	PARÂMETRO AFETADO	MOTIVO	INDICADORES	AÇÃO CORRETIVA
Aglutininas frias	ERI ↓, VCM ↑, CHCM ↑	Aglutinação de ERI	Dupla população ou desvio à direita no histograma de ERI	Aquecer a amostra a 37 °C e reanalisar
Lipemia e icterícia	Hgb ↑, HCM ↑	O aumento da turbidez afeta a leitura espectrofotométrica	$Hgb \times 3 \neq VG \pm 3$	Substituição do plasma por igual quantidade de diluente
Hemólise	ERI ↓, VG ↓	Os ERI lisados não são contados	$Hgb \times 3 \neq VG \pm 3$	Requisitar nova amostra
Eritrócitos resistentes à lise com Hgb anormal	LEU ↑, Hgb ↑	ERI contendo Hgb S, C ou F pode resistir à lise e ser contado como LEU	Presença de ruídos nos histogramas e citogramas de LEU	Realizar diluições manuais e conceder tempo de incubação para que ocorra a lise
Micrócitos e esquistócitos	ERI ↓, Plaq ↑	Micrócitos e esquistócitos < que o limite de corte inferior para ERI	Desvio à esquerda no histograma de ERI. O VCM é sinalizado se for menor que o limite inferior	Revisar a lâmina. Estimativa do número de plaquetas por método indireto <sup>14</sup>
Eritroblastos e fragmentos de núcleo de megacariócitos	LEU ↑	Ambos são contados como LEU	Alerta morfológico de eritroblastos	Contar eritroblastos e fragmentos de núcleo de megacariócitos e corrigir LEU
Agregados plaquetários	Plaq ↓, LEU ↑	Agregados plaquetários podem ser contados como LEU	Alerta morfológico de agregados plaquetários	Recoletar a amostra em citrato de sódio e multiplicar o resultado por 1,1
LEU > 100.000/μL	ERI ↑, Hgb ↑, HCT incorreto, índices anormais	Aumento da turbidez para Hgb; LEU são contados juntos com ERI	$Hgb \times 3 \neq VG \pm 3$ ; contagem de LEU pode estar acima da linearidade	Fazer micro-hematócrito. Fazer Hgb após substituição do plasma por igual quantidade de diluente. Corrigir ERI em função de LEU. Recalcular índices. Se LEU estiver acima da linearidade, diluir amostra para corrigir contagem
Tratamento quimioterápico para leucemia	LEU falsamente ↓, Plaq falsamente ↑	LEU frágeis; fragmentos de citoplasma são contados como Plaq	Contagem de plaquetas é inconsistente com resultados anteriores	Revisar a lâmina. Contar plaquetas por microscopia com contraste de fase ou outro método alternativo
Amostra antiga	VCM ↑, VPM ↑, Plaq ↓, contagem diferencial de LEU pode estar incorreta	ERI incham-se conforme amostra envelhece. Plaq incham-se e degeneram-se. Os leucócitos são afetados por longos períodos de exposição ao EDTA	Presença de agrupamentos anormais nos histogramas e citogramas de LEU	Estabelecer critérios de aceitação e rejeição de amostras

↑, aumentado; ↓, diminuído; Hgb, hemoglobina; VG, volume globular; ERI, eritrócitos; LEU, leucócitos; Plaq, plaquetas; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média, CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; VPM, volume plaquetário médio; EDTA, ácido etilenodiaminotetracético.

Fonte: Comar e Pasquini.<sup>16</sup>



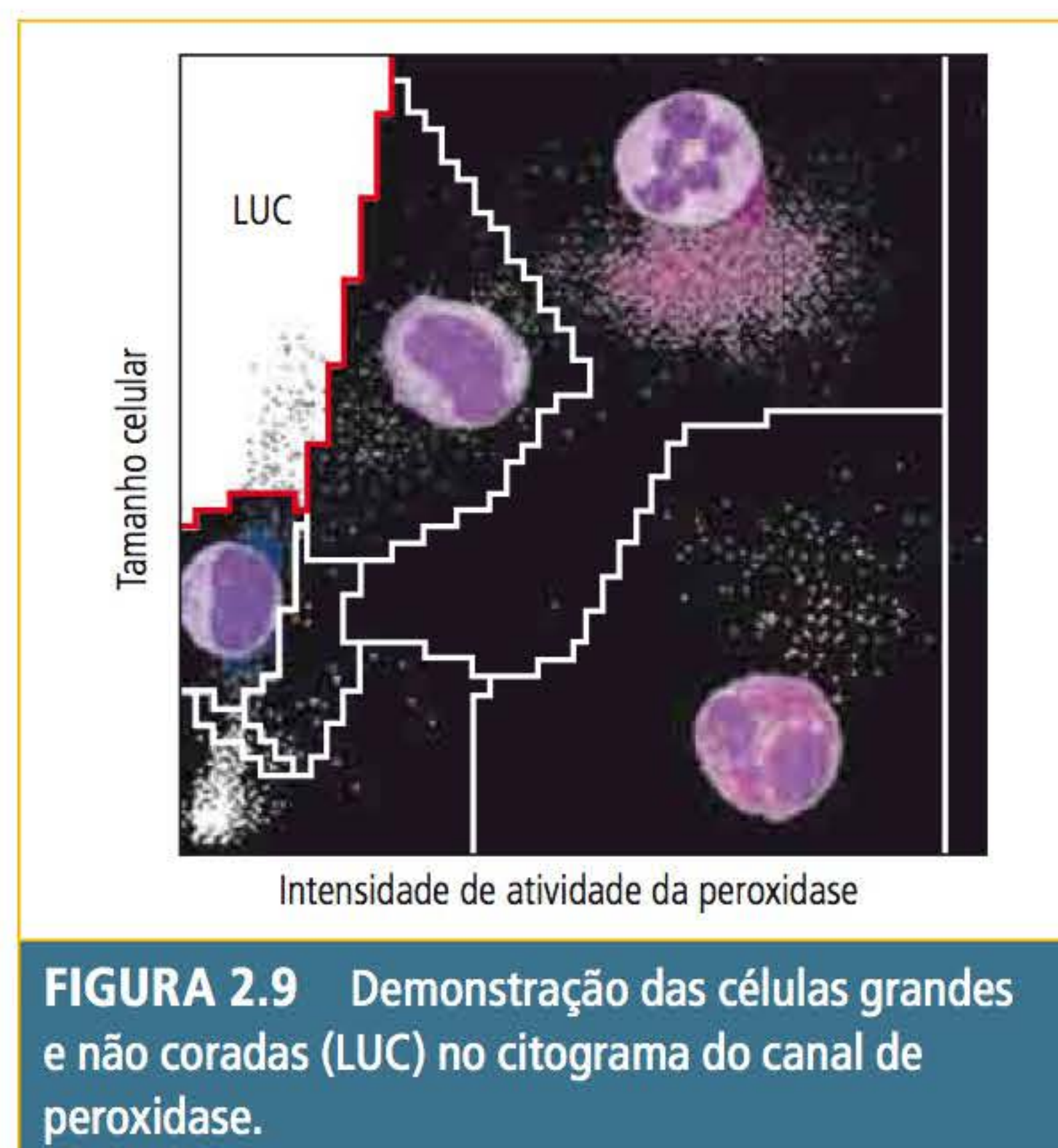
fabricante. A presença de tais células somente era indicada por alertas qualitativos e, com a contagem estendida, passaram a ser quantificadas em termos relativos e absolutos. Atualmente, os tipos celulares incluídos na contagem diferencial estendida são células imaturas ou atípicas, tais como blastos, granulócitos imaturos, linfócitos atípicos, células progenitoras hematopoiéticas e eritroblastos. Alguns dos principais objetivos da contagem diferencial estendida são obter contagens mais precisas e exatas para populações celulares raras; possibilitar contagens diferenciais em amostras com composição celular mais complexa que o sangue periférico como, por exemplo, medula óssea e sangue de cordão umbilical; além de possibilitar a redução de revisões microscópicas das lâminas de hemogramas na rotina laboratorial. Nos parágrafos seguintes, serão descritos os principais componentes da contagem diferencial estendida e suas aplicações.

## ■ CÉLULAS GRANDES E NÃO CORADAS

Os analisadores hematológicos Advia 120/2120 (Siemens®) realizam contagens de populações adicionais de leucócitos, denominadas de células grandes não coradas (LUC, do inglês *large unstained cells*). O princípio é baseado na detecção do nível de atividade da enzima peroxidase que as células apresentam, a qual é evidenciada por um corante específico. As células grandes não coradas não possuem peroxidase e, portanto, não são coradas. As células grandes não coradas podem ser constituídas por blastos, linfócitos atípicos, eritroblastos jovens, células plasmáticas ou, simplesmente, por neutrófilos com reação negativa à peroxidase. Trata-se de uma contagem com baixa especificidade pelo fato de não haver relação evidente entre LUC e suas contrapartidas celulares individuais.<sup>25</sup> Pode ser usada como critério para que seja realizada a revisão microscópica da lâmina de hemograma quando possui valor  $\geq 5\%$ . A **Figura 2.9** mostra o citograma do canal de peroxidase que origina a contagem das células grandes e não coradas. Esse citograma é estabelecido em função do tamanho celular (Y) e intensidade de atividade da enzima peroxidase (X).

## ■ CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

A contagem de células progenitoras hematopoiéticas (HPC, do inglês *hematopoietic progenitor cells*) pode ser utilizada para definir o momento



**FIGURA 2.9** Demonstração das células grandes e não coradas (LUC) no citograma do canal de peroxidase.

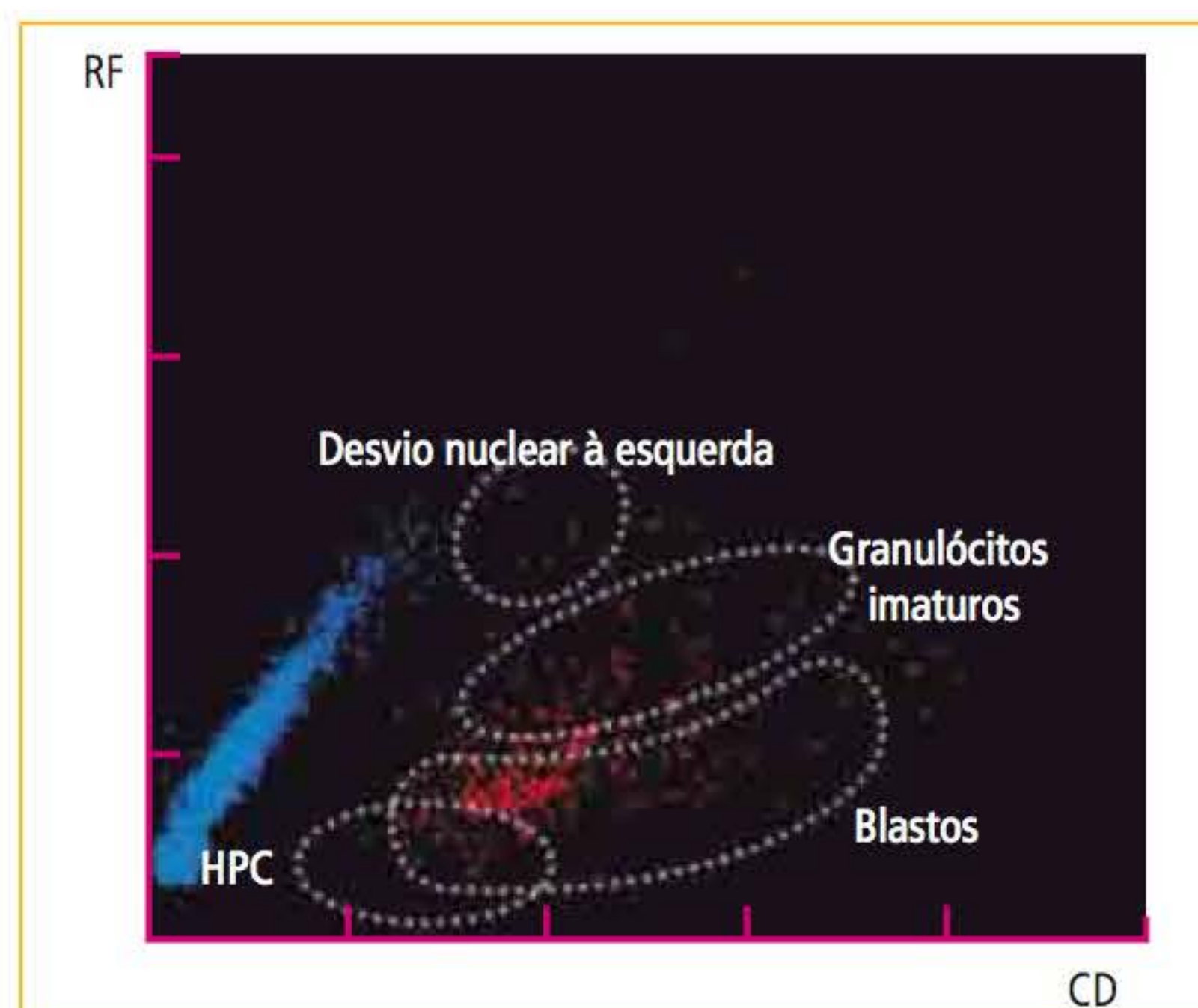
Fonte: Adaptada de Siemens Healthcare Diagnostics.<sup>26</sup>

ideal de se realizar a aférese para que se obtenha um número suficiente dessas células na circulação periférica, após sua mobilização por meio de fatores de crescimento hematopoiéticos, com o intuito de auxiliar a realização de transplantes. Normalmente, os valores de corte utilizados para determinar o momento da coleta de HPC podem variar de 10 a 20 HPC CD34<sup>+</sup>/μL, e o método recomendado para tal contagem é a citometria de fluxo com anticorpo monoclonal anti-CD34. Contudo, esse método é moroso, apresenta custo elevado e requer equipe experiente.<sup>25</sup>

Nos analisadores hematológicos XE-2100 e XE-5000 (Sysmex®), foi proposto um método alternativo de pesquisa de HPC que não requer anticorpos monoclonais e que pode ser realizado simultaneamente às contagens automatizadas de rotina. Nesse método, as HPCs são determinadas utilizando-se uma combinação de impedância, radiofrequência e lise seletiva (**Figura 2.10**).

A contagem de HPC possui elevada sensibilidade e valor preditivo negativo e pode ser utilizada como teste de *screening* para exclusão de candidatos para aférese de células tronco no sangue periférico após mobilização com G-CSF, na qual a contagem de HPC é baixa ( $< 20$  HPC/μL). Por outro lado, contagem de HPC maior que 20 a 30/μL indica a possibilidade de coleta de células tronco. A contagem de HPC possui um valor preditivo positivo de 67%, indicando que quando HPC for  $> 20$  a 30/μL, em 67% das vezes a contagem de células





**FIGURA 2.10** Demonstração das células progenitoras hematopoiéticas (HPC) no citograma do canal IMI, que combina impedância, radiofrequência e lise seletiva.

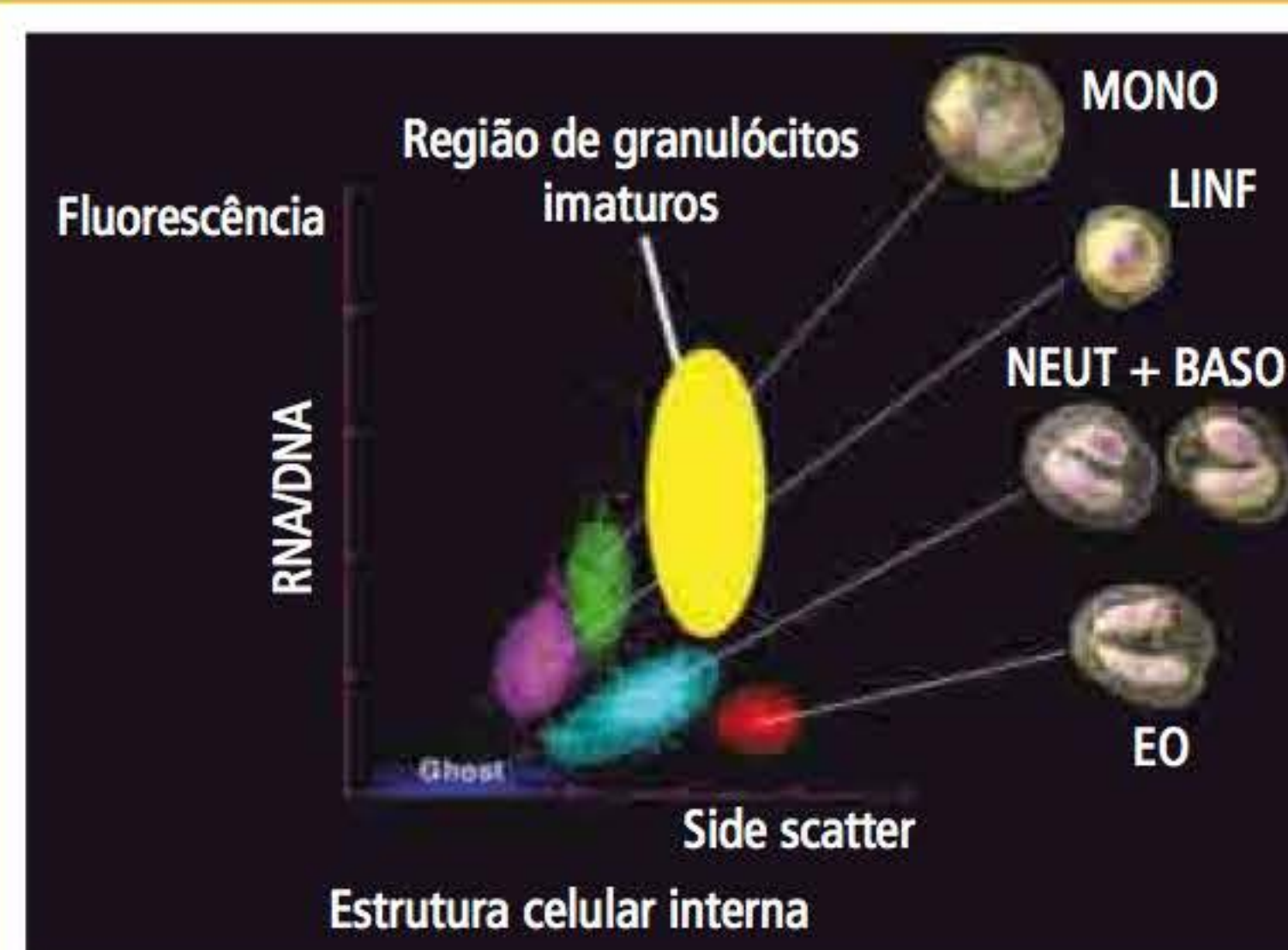
RF, radiofrequência; CD, corrente direta (impedância).

Fonte: Adaptada de Sysmex®.<sup>27</sup>

tronco CD34<sup>+</sup> também estará elevada, indicando que a aférese pode ser realizada. Nos 33% restantes, a aférese pode necessitar de processamento adicional de sangue para atingir a concentração adequada de células tronco. Outra potencial utilidade do parâmetro HPC é a estimativa da quantidade de células tronco em sangue de cordão umbilical destinado a transplantes, uma vez que se poderiam identificar unidades de sangue de cordão com alta concentração dessas células, assim como unidades que não atendem aos critérios mínimos para se realizar o processamento de obtenção de células tronco.

## :: GRANULÓCITOS IMATUROS

Células como metamielócitos, mielócitos e pró-mielócitos, todas incluídas no compartimento de granulócitos imaturos, podem ser contadas por alguns analisadores pela citometria de fluxo.<sup>28</sup> A contagem de granulócitos imaturos (IG, do inglês *immature granulocytes*) engloba a soma de metamielócitos, mielócitos e pró-mielócitos e é disponibilizada nos analisadores XE-2100, XT-4000i e XE-5000 (Sysmex®), como parâmetro reportável, e no analisador Pentra DX 120 (Hori-ba Medical®), como parâmetro de pesquisa e ainda não reportável. O princípio de contagem é baseado em citometria de fluxo após coloração do RNA e DNA das células por um corante fluorescente (Figura 2.11).



**FIGURA 2.11** Demonstração dos granulócitos imaturos no citograma de diferencial de leucócitos em função da fluorescência e desvio da luz lateral.

Fonte: Adaptada de Sysmex®.<sup>27</sup>

Contagens aumentadas de granulócitos imaturos no sangue periférico têm se mostrado potencialmente úteis no diagnóstico de septicemia neonatal. Portanto, a contagem de IG se constitui uma alternativa à contagem de bastões, na qual o critério morfológico é muito variável, além de ter várias outras fontes de erro.<sup>30</sup>

Os granulócitos imaturos, normalmente ausentes no sangue periférico, podem estar aumentados em situações como infecções bacterianas, doenças inflamatórias agudas e câncer, particularmente aqueles com metástase óssea. Também podem estar aumentados na necrose tecidual, rejeição aguda aos transplantes, traumatismos cirúrgicos e ortopédicos, doenças mieloproliferativas, uso de esteroides e na gravidez, principalmente durante o terceiro trimestre. Nesses casos, o aumento dos granulócitos imaturos é acompanhado do aumento nos neutrófilos, os quais são lançados na circulação advindos do *pool* marginal e da medula óssea.

Em alguns indivíduos, especialmente pessoas idosas, neonatos e pacientes mielossuprimidos, o aumento da contagem de neutrófilos pode não ser observado como nas situações descritas no parágrafo anterior, pois os neutrófilos podem estar ausentes. Em outras circunstâncias, tais como septicemias, pode até ocorrer neutropenia. Sendo assim, o aumento dos granulócitos imaturos em porcentagem superior a 2%, mesmo se isolado, pode ser útil para identificar uma infecção aguda, mesmo quando não há suspeita clínica.

Contagens automatizadas de IG > 2% podem ser consideradas como indicativo da necessidade de revisão microscópica das lâminas de hemograma.



As contagens microscópicas de granulócitos imaturos são, na maioria das vezes, imprecisas<sup>31,32</sup> em virtude de essas células serem, geralmente, encontradas em baixas concentrações (< 10%), o que provoca diminuição da sensibilidade clínica. Os analisadores hematológicos citados anteriormente podem contar os granulócitos imaturos ao executar a contagem diferencial de leucócitos com uma imprecisão notavelmente baixa, próxima de 7%. A exatidão, quando comparada com a contagem microscópica ou por citometria de fluxo com o emprego de anticorpos monoclonais, é igualmente elevada. A contagem de IG tem uma especificidade elevada para circunstâncias infecciosas (83-97%), mas são acompanhadas da baixa sensibilidade (entre 35-40%). Esta baixa sensibilidade significa que essa contagem não é indicada como um teste de triagem para a infecção, mesmo que uma associação significativa exista entre contagens elevadas de granulócitos imaturos e hemoculturas positivas.

## ERITROBLASTOS

Normalmente, os eritroblastos estão presentes em sangue periférico de recém-nascidos, mas em baixas concentrações. Eles podem apresentar-se em concentrações elevadas na doença hemolítica do recém-nascido, e alguns estudos indicam um aumento da concentração de eritroblastos em neonatos prematuros com hipóxia no período perinatal.

Os eritroblastos também podem ser visualizados no sangue periférico de adultos como, por exemplo, nas síndromes talassêmicas, doenças mieloproliferativas, especialmente a mielofibrose, tumores sólidos metastáticos na medula óssea, hematopoiese extramedular além de muitas condições que geram estresse hematopoiético como septicemia, hemorragia maciça e hipoxia grave. Nessas situações, a presença de eritroblastos é correlacionada com a gravidade do prognóstico. Contagens aumentadas de eritroblastos no sangue periférico de pacientes que se submeteram a transplante de medula óssea se correlacionam com o aumento da mortalidade. Em outras situações, a contagem de eritroblastos é útil para avaliar a eficácia da terapia transfusional nas talassemias, sendo aconselhável manter uma contagem de eritroblastos de menos de 5 para cada 100 leucócitos.

As contagens microscópicas manuais possuem limitações na precisão e na exatidão de populações de células raras, como os eritroblastos, podendo,

às vezes, negligenciar a presença dessas células. Em amostras com elevada concentração de eritroblastos, os analisadores podem superestimar a contagem de leucócitos e de linfócitos. De fato, quase todos os analisadores hematológicos contam os eritroblastos parcial ou inteiramente como linfócitos. Atualmente, alguns analisadores hematológicos, como o Cell Dyn Sapphire (Abbott®), Pentra DX 120 (Horiba Medical®), LH 780 (Beckman Coulter®), Advia 2120 (Siemens®) e série XN (Sysmex®), realizam a contagem de eritroblastos conjuntamente com a contagem diferencial de leucócitos. Já nos analisadores XE-2100 e XE-5000 (Sysmex®), a determinação desse parâmetro deve ser programada separadamente, necessitando ainda de reagentes adicionais (**Figura 2.12**). Nos analisadores citados, a contagem de leucócitos e linfócitos é corrigida em função da concentração de eritroblastos presentes na amostra.

Resultados publicados indicam excelente desempenho em termos de precisão, com coeficiente de exatidão e de variação inferior a 10%, mesmo quando a contagem automatizada de eritroblastos é avaliada em comparação com a contagem microscópica ou por citometria de fluxo com anticorpos monoclonais. Os coeficientes de correlação encontrados na literatura situam-se entre 0,90 e 0,99, enquanto os limites de detecção, dependendo do analisador, encontram-se entre 1 e 2 eritroblastos/100 leucócitos.<sup>25,29</sup>

## NOVOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os analisadores hematológicos estão cada vez mais sofisticados, e o número de parâmetros disponíveis e reportáveis vem aumentando. Tais parâmetros possuem um grande potencial para serem utilizados na prática médica e podem permitir o desenvolvimento de novos indicadores para certas doenças e anormalidades morfológicas. Esses novos parâmetros requerem conhecimento especializado no que se refere a sua interpretação e a limitações analíticas, o que torna necessária a realização de constantes atualizações por parte dos médicos e profissionais do laboratório. Apesar da importância das informações fornecidas pelos novos parâmetros hematológicos, torna-se imperativa a realização de boas práticas laboratoriais para assegurar a confiabilidade dos resultados reportados. Os laboratórios devem realizar controle de qualidade interno desses parâmetros para garantir que as determinações sejam



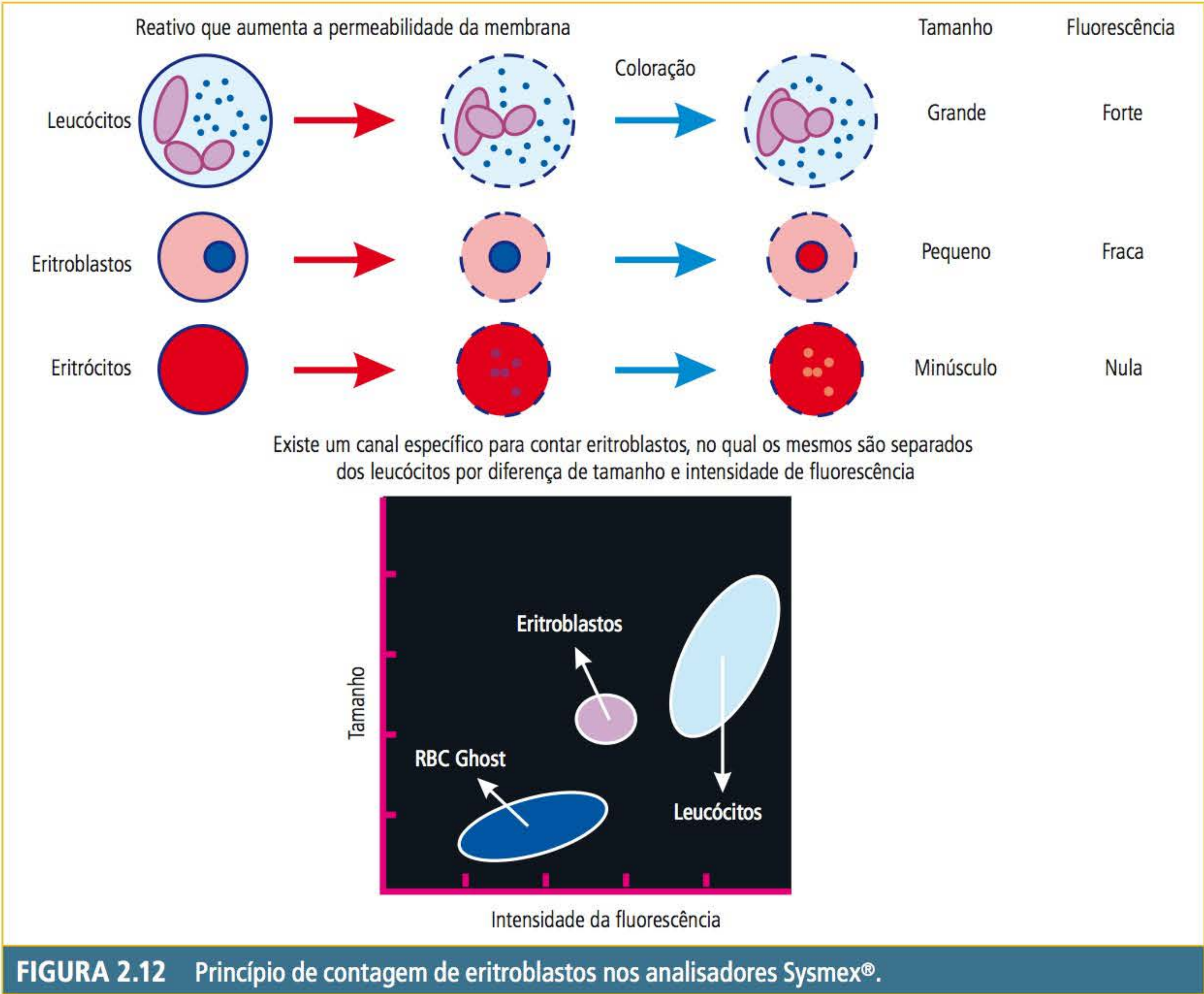


FIGURA 2.12 Princípio de contagem de eritroblastos nos analisadores Sysmex®.

Fonte: Adaptada de Sakata.<sup>33</sup>

suficientemente precisas e exatas. Os resultados das amostras dos pacientes não devem ser liberados caso não seja demonstrado, por um controle de qualidade interno, que os procedimentos analíticos são, de fato, válidos e isentos de problemas. Em alguns analisadores que possuem parâmetros que estão disponíveis na ausência de material de controle interno disponibilizado pelo fabricante, especificações de qualidade devem ser definidas,<sup>34</sup> e os resultados devem ser reportados com cautela. É importante, ainda, que o laboratório participe de um programa de qualidade de avaliação externa, de modo que seja possível identificar os melhores métodos para determinar um parâmetro em particular e identificar os métodos não confiáveis. O controle externo também tem um papel essencial na manutenção e melhoria da qualidade analítica e adequação dos dados laboratoriais. Nos tópicos a seguir, será discutido o essencial sobre os novos parâmetros hematológicos disponibilizados pelos mais modernos analisadores hematológicos.

FRAÇÃO DE RETICULÓCITOS IMATUROS E ÍNDICES RETICULOCITÁRIOS

Heilmeyer, em 1931, foi um dos primeiros pesquisadores a propor a classificação dos reticulócitos baseada na sua própria maturação, a qual é definida pela quantidade de filamentos reticulares presentes em um reticulócito.<sup>35</sup> Inicialmente, essa observação era realizada por meio de microscopia óptica após coloração supravital das células pelo azul de cresil brilhante.<sup>36</sup>

Apesar de existir um grande potencial da aplicação da classificação baseada na maturação dos reticulócitos como um índice da atividade eritropoiética da medula óssea, sua aplicação clínica é limitada em virtude dos resultados serem pouco reprodutíveis na classificação manual.

Posteriormente, foi demonstrado que os filamentos reticulares dos reticulócitos eram compostos de proteína e RNA ribossomal. A introdução de métodos citométricos que usam corantes que se



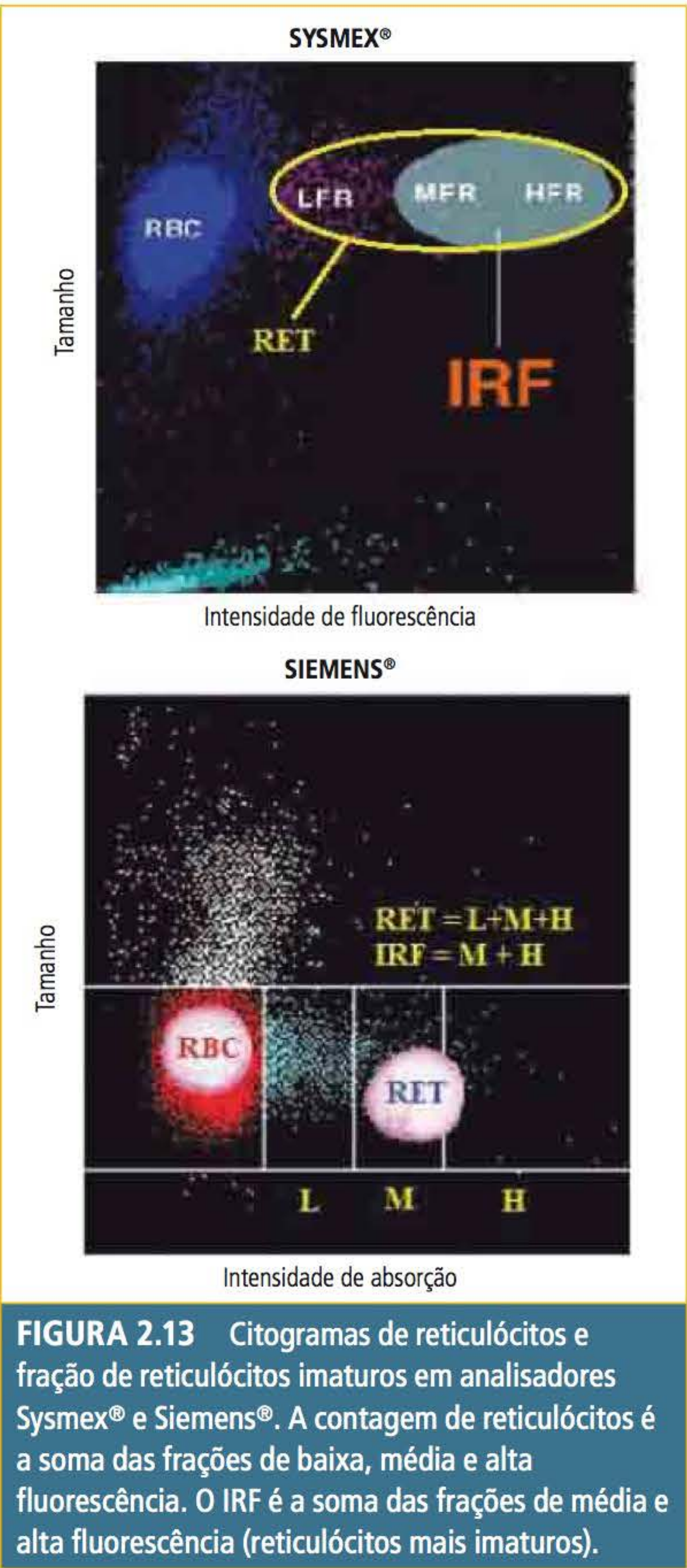
ligam seletivamente no RNA, sendo, portanto, capazes de gerar sinais reprodutíveis proporcionais ao conteúdo desse ácido nucleico, despertaram novamente o interesse pelo índice de maturação dos reticulócitos.

O termo fração de reticulócitos imaturos (IRF, do inglês *immature reticulocyte fraction*) foi introduzido para indicar a quantidade de reticulócitos que se encontram, em determinada amostra, em fases imaturas da diferenciação celular, ou seja, com conteúdo de RNA em quantidades mais elevadas.<sup>37-39</sup>

Os analisadores mais modernos de cada fabricante fornecem o IRF e a maioria deles, por meio de citometria de fluxo, divide os reticulócitos em três populações distintas (de alta, média e baixa fluorescência), baseadas no conteúdo de RNA presente nos reticulócitos (Figura 2.13). Como as técnicas de contagem variam entre os analisadores, os intervalos de referência podem ser diferentes, e a comparação de amostras analisadas por técnicas diferentes pode ser um problema.

Porém, independentemente da maneira pela qual é produzida, a IRF pode ser considerada um índice sensível e precoce da eritropoiese. Uma aplicação particularmente útil durante uma reticulocitopenia é a identificação precoce da regeneração medular em pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou quimioterapia. Nessas condições, como marca da reticulocitopenia, pode-se observar o reaparecimento de reticulócitos com alto conteúdo de RNA. Particularmente, nos transplantes de medula óssea, um aumento na fração de reticulócitos imaturos pode prever o sucesso do transplante antes mesmo do aumento da contagem absoluta de neutrófilos e da contagem de reticulócitos.

Esse parâmetro pode ser útil para distinguir anemias caracterizadas pelo aumento da eritropoiese, como as anemias hemolíticas adquiridas ou perda de sangue, as quais produzem um aumento na contagem de reticulócitos e na IRF. Também é útil na classificação de anemias devido à atividade medular reduzida como na doença renal crônica, na qual a contagem de reticulócitos e a IRF estão reduzidas, e também em situações como infecções agudas e síndromes mielodisplásicas, nas quais ocorre uma dissociação entre a contagem de reticulócitos, que pode estar aumentada ou diminuída, e a fração de reticulócitos imaturos, a qual está aumentada.



**FIGURA 2.13** Citogramas de reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos em analisadores Sysmex® e Siemens®. A contagem de reticulócitos é a soma das frações de baixa, média e alta fluorescência. O IRF é a soma das frações de média e alta fluorescência (reticulócitos mais imaturos).

LFR e L, reticulócitos de baixa fluorescência; MFR e M, reticulócitos de média fluorescência; HFR e H, reticulócitos de alta fluorescência.

Outras aplicações incluem monitoramento da eficácia de terapias nas anemias nutricionais, em virtude do aumento da IRF preceder o aumento da contagem de reticulócitos em vários dias. Os problemas decorrentes do uso generalizado desse índice estão relacionados à variação da sensibilidade analítica dos diferentes analisadores hematológicos, a qual é alta em analisadores que utilizam métodos fluorescentes, e à dificuldade em comparar resultados obtidos de diferentes modelos de um mesmo fabricante ou de fabricantes diferentes.



A última geração de analisadores hematológicos fornece alguns índices reticulocitários referentes ao tamanho e ao conteúdo de hemoglobina análogos aos índices dos eritrócitos. Entre eles, os mais promissores do ponto de vista clínico são o CHr (conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos) e o VCMr (volume corpuscular médio dos reticulócitos) ou MRV (volume médio de reticulócitos, do inglês *mean reticulocyte volume*), dependendo do analisador. O CHr reflete diretamente a síntese de hemoglobina nos precursores eritroides da medula óssea e pode ser considerado uma ferramenta para avaliar a disponibilidade de ferro para síntese de hemoglobina. Também é importante, em virtude da sua diminuição, indicar eritropoiese deficiente de ferro, mesmo em condições nas quais marcadores bioquímicos tradicionais, como ferritina e transferrina, são inadequados, como nos casos de inflamações ou anemia de doença crônica. Também é útil para o monitoramento da terapia com ferro intravenoso pelo fato de aumentar significativamente depois de 48 horas. Exceções são observadas em indivíduos heterozigotos para  $\beta$ -talassemia, nos quais o CHr está sempre reduzido independentemente dos níveis de ferro estocados no organismo.

Valores baixos de CHr (VR = 23,3 – 34,1 pg) são indicativos de eritropoiese deficiente de ferro em pacientes submetidos à diálise e até mesmo em carências funcionais, as quais ocorrem em pacientes tratados com eritropoietina. O CHr é considerado, por alguns autores, o índice de maior confiabilidade para avaliar anemia por deficiência de ferro, mesmo em populações pediátricas. Já para o VCMr, poucos estudos sobre a sua utilidade clínica estão disponíveis. Em indivíduos com estoque de ferro diminuído, esse índice aumenta rapidamente após a terapia com ferro e diminui igualmente com o desenvolvimento de uma eritropoiese deficiente de ferro. O VCMr diminui, e os reticulócitos são menores que os eritrócitos circulantes encontrados na macrocitose da anemia megaloblástica após terapia com vitamina B<sub>12</sub> e/ou ácido fólico. O VCMr multiplicado pelo número de reticulócitos fornece o valor do hematócrito dos reticulócitos, o qual é utilizado, juntamente com o CHr e, em geral, está aumentado nesses casos, para avaliar possível abuso de eritropoietina em atletas de alto rendimento.

Também notou-se que um aumento súbito na relação VCMr/VCM constitui um dos primeiros

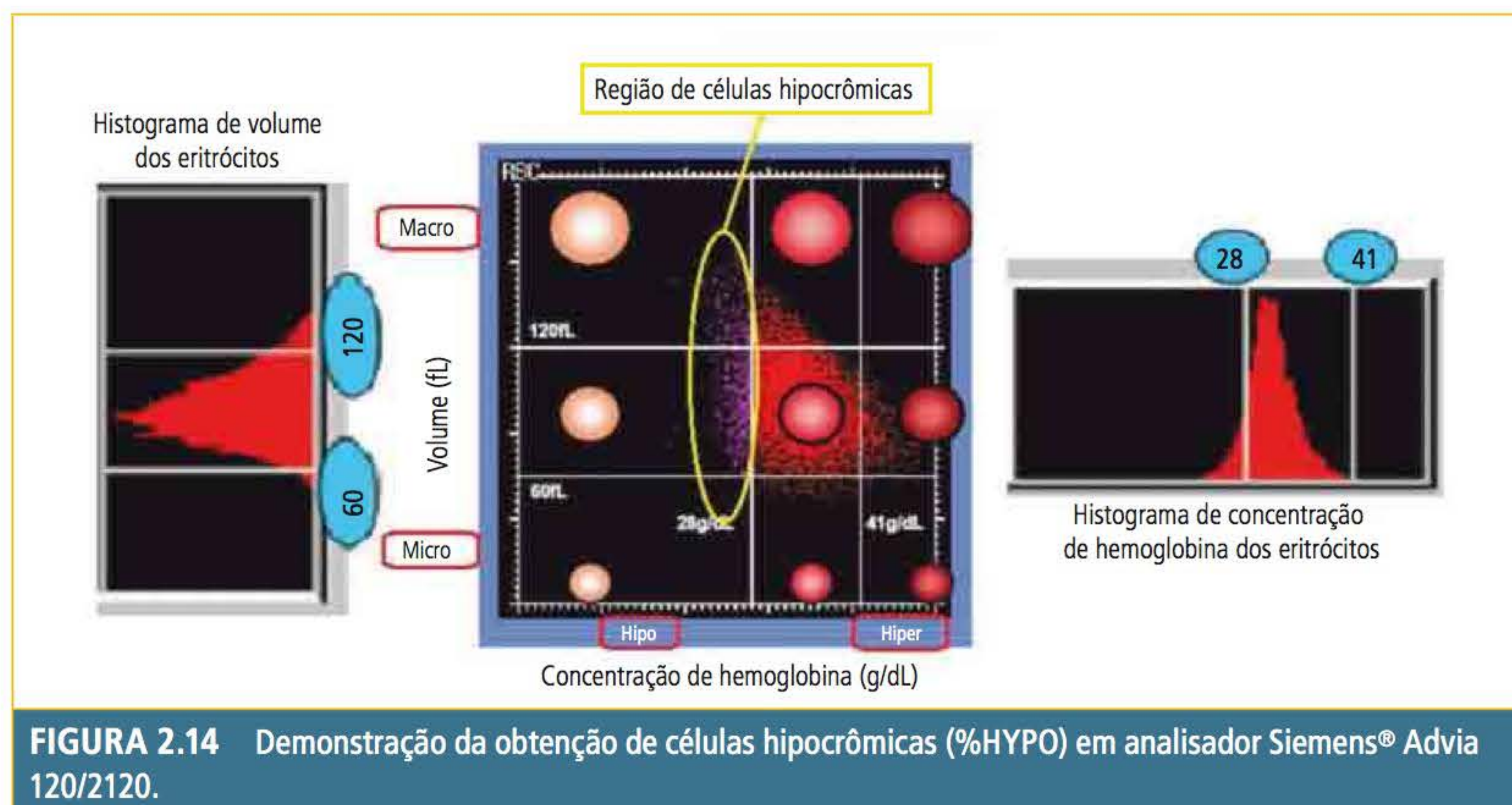
sinais da resposta eritropoiética após um transplante de medula óssea. Portanto, o CHr e o VCMr possuem utilidades clínicas que muitas vezes se sobrepõem. Mais recentemente, a Beckman Coulter® desenvolveu um parâmetro que relaciona o volume dos eritrócitos e reticulócitos chamado de fator de tamanho das células vermelhas (RSf, do inglês *red cells size factor*), o qual possui boa correlação com o CHr.

Atualmente, a principal limitação para o uso desses índices está relacionada ao pequeno número de analisadores que podem fornecê-los. O CHr está disponível como parâmetro reportável apenas no analisador hematológico Advia 120/2120 (Siemens®) e como parâmetro de pesquisa no analisador Cell-Dyn Sapphire (Abbott®). Um índice semelhante ao CHr, denominado de equivalente de hemoglobina dos reticulócitos (Ret-He; VR = 24.1 – 35,8 pg), é fornecido pelos analisadores XT-4000i, XE-2100 E XE-5000 (Sysmex®). O VCMr produzido por vários analisadores apresenta problemas de padronização que tornam difícil a comparação dos resultados obtidos por analisadores de diferentes fabricantes. Em uma avaliação paralela, os intervalos de referência foram, respectivamente, 91-111 fL para o analisador hematológico Pentra DX 120 (Horiba Medical®), 98-120 fL para o modelo LH-750 da Beckman Coulter® e 100-114 fL para o analisador Advia 120/2120 da Siemens®.

## PARÂMETROS RELACIONADOS COM O CONTEÚDO DE HEMOGLOBINA DOS ERITRÓCITOS

Alguns analisadores fornecem histogramas de distribuição da concentração de hemoglobina observada em cada eritrócito, sendo capazes de indicar a presença de eritrócitos hipocrômicos e hiperocrômicos. A porcentagem de células hipocrômicas (%HYPO), definidas como a porcentagem de eritrócitos com concentração de hemoglobina celular < 28 g/dL, tem sido descrita como um bom marcador de deficiência funcional de ferro em pacientes submetidos à hemodiálise. Assim, na prática, durante a terapia com eritropoietina recombinante humana (rHuEpo), um aumento de eritrócitos hipocrômicos > 10% (valor de referência até 2,5%), poderia indicar a necessidade de aumento na suplementação de ferro. Esse parâmetro é fornecido pelos analisadores Advia 120/2120 (Siemens®) (**Figura 2.14**), XE-2100 e XE-5000 (Sysmex®) e Cell-Dyn Sapphire (Abbott®).





**FIGURA 2.14** Demonstração da obtenção de células hipocrômicas (%HYPO) em analisador Siemens® Advia 120/2120.

Fonte: Adaptada de Siemens Healthcare Diagnostics.<sup>26</sup>

Os analisadores Beckman Coulter® fornecem um parâmetro semelhante, chamado de baixa densidade de hemoglobina (LDH%, do inglês *low hemoglobin density*), o qual é derivado do CHCM utilizando uma transformação matemática sigmoidal. Estudos demonstraram que o LDH% possui significância clínica semelhante a %HYPO para determinar o *status* de ferro e sua disponibilidade para eritropoiese. Alguns estudos relataram que a %HYPO é mais sensível para diagnosticar deficiência funcional de ferro, enquanto o CHr ou Ret-He evidenciam melhor a resposta ao tratamento com ferro. O grau de variação na concentração de hemoglobina dos eritrócitos é quantificado pelo parâmetro HDW (do inglês *hemoglobin distribution width*), análogo ao RDW e fornecido pelo analisador Siemens® Advia 120/2120. O intervalo de referência é 1,82 a 2,64 g/dL, e valores alterados podem ser observados na anemia ferropriva em tratamento e em transfusões sanguíneas. O HDW é uma medida quantitativa da anisocromia. Os analisadores da Beckman Coulter®, série LH, fornecem um parâmetro chamado volume corpuscular esférico médio (MSCV, do inglês *mean spherized corpuscular volume*), que é obtido durante a contagem de reticulócitos, sob condições de baixa osmolaridade. O MSCV é conhecido como o índice de modificação da forma dos eritrócitos, uma vez que os eritrócitos são capazes de sofrer uma expansão osmótica, enquanto os esferócitos

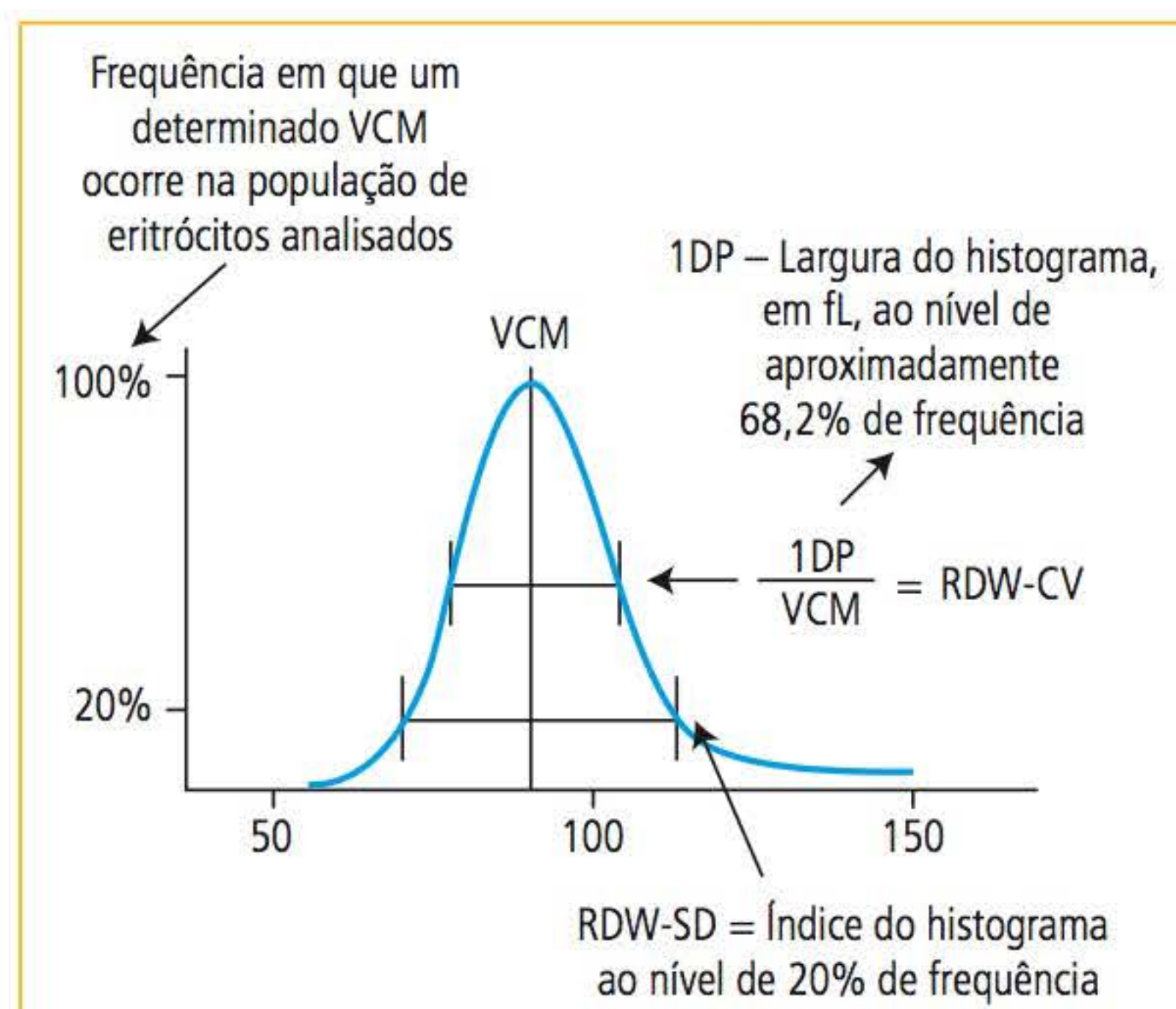
não. Esses últimos se fragmentam assim que atingem um volume crítico, que é consistente com a diminuição do MSCV. Esse achado constitui um aperfeiçoamento confiável para rastrear amostras de pacientes com eliptocitose hereditária e algumas anemias hemolíticas autoimunes. Nessas amostras, o MSCV é sempre menor que o VCM, e diferenças menores que 9,6 fL (VCM – MSCV) possuem boa sensibilidade e especificidade para rastrear tais patologias.

## **ÍNDICE DE ANISOCITOSE OU VARIAÇÃO DO TAMANHO DOS ERITRÓCITOS**

Os analisadores hematológicos modernos calculam, a partir do histograma eritrocitário, um índice de heterogeneidade do tamanho dos eritrócitos conhecido como RDW (do inglês *red cell distribution width*). Esse índice quase sempre é expresso como coeficiente de variação em porcentagem (RDW-CV), mas também pode ser expresso como desvio-padrão (RDW-SD), particularmente nos analisadores Sysmex®, Beckman Coulter® e Mindray®.

O RDW-SD é determinado calculando-se o índice de distribuição de tamanho dos eritrócitos no nível de 20% da altura do histograma e é expresso em fentolitros (fL). Já o RDW-CV é calculado matematicamente como o coeficiente de variação, ou seja,  $RDW-CV = 1SD/VCM \times 100\%$ , conforme **Figura 2.15**.





**FIGURA 2.15** Obtenção do RDW-CV e RDW-SD a partir do histograma de distribuição dos volumes eritrocitários.

1DP, 1 desvio-padrão, VCM, volume corpuscular médio (fL).

Fonte: Adaptada de Caporal e Comar.<sup>40</sup>

Alguns trabalhos sugerem que o RDW-CV tem mais sensibilidade em detectar anisocitose em faixas de VCM microcíticos (VCM < 80 fL) e que o RDW-SD é mais sensível em VCM normocíticos ( $80 \leq \text{VCM} \leq 99$ ) e macrocíticos (VCM > 99). Apesar do RDW-CV e do RDW-SD possuírem desempenhos diferentes em detectar anisocitose em lâmina conforme a faixa de VCM, ambos se complementam e devem ser utilizados em conjunto na identificação de heterogeneidade dos tamanhos eritrocitários.<sup>41-42</sup>

Um RDW dentro dos valores de referência indica que os eritrócitos possuem um padrão de distribuição de tamanho que se aproxima do normal de uma população. Isso sugere a presença de uma população homogênea de células, mas não necessariamente que todas possuem tamanho normal. É importante deixar claro que um RDW normal não exclui a presença de uma quantidade significativa de células que são muito maiores ou muito menores que a população majoritária de células, o que também não significa que a população majoritária de eritrócitos seja normal.

Um RDW aumentado indica um aumento da variabilidade do tamanho dos eritrócitos, que também é conhecida como anisocitose e é comumente observado nas deficiências nutricionais, como a de ferro, folato e vitamina B<sub>12</sub>, uma vez que a quantidade desses nutrientes que está disponível para os precursores de células vermelhas pode variar amplamente, podendo resultar em

alterações do tamanho eritrocitário. O RDW pode ser considerado uma medida semiquantitativa de anisocitose, não sendo suficientemente sensível para ser utilizado na ausência de anemia. Há um desejo natural de se utilizar as várias combinações possíveis de VCM e RDW para orientar a conduta médica para possíveis diagnósticos; no entanto, tal prática pode levar a erros e jamais deve tomar o lugar de investigações laboratoriais mais específicas, incluindo a análise da lâmina de sangue periférico.

Mesmo nos casos em que o RDW é expresso da mesma maneira, os intervalos de referência calculados para indivíduos saudáveis diferem quando realizados por analisadores de diferentes fabricantes e, algumas vezes, mesmo em diferentes modelos de um mesmo fabricante. Isso pode ser explicado pelo fato de os analisadores utilizarem diferentes algoritmos para analisar a distribuição das células, os quais são indispensáveis para eliminar valores extremos, normalmente devido a artefatos.

Para tornar os resultados obtidos de diferentes analisadores comparáveis, o ICSH sugeriu um método estatístico para a análise da distribuição do volume celular. Contudo, esse método não tem produzido resultados e, dessa forma, qualquer consideração a respeito do uso clínico do RDW deve ser avaliada por meio de uma comparação com valores de referência estabelecidos para cada modelo de analisador.

## FRAGMENTOS ERITROCITÁRIOS

Os fragmentos eritrocitários, também chamados de esquistócitos ou esquizócitos, são eritrócitos fragmentados, formados em decorrência de um dano mecânico. Eles podem ser encontrados no sangue periférico de pacientes com várias doenças, como, por exemplo, doenças cardiovasculares, válvulas prostéticas, endocardites, microangiopatias e púrpura trombótica. Nestas duas últimas categorias, os esquistócitos precisam ser imediatamente identificados para um correto diagnóstico e tratamento, haja vista sua identificação e sua quantificação representarem um importante critério diagnóstico. A quantificação dos esquistócitos também foi proposta para a definição de um sistema de classificação e monitoramento de transplantes de células tronco associados à microangiopatia.

Os fragmentos eritrocitários são, em geral, avaliados pela microscopia óptica, e as diferenças observadas podem depender da falta de padroni-



zação da definição morfológica de esquistócitos e da alta imprecisão em contá-los em virtude de sua baixa concentração. Um coeficiente de variação entre observadores de 50% foi descrito para uma concentração de esquistócitos de 10%.

Três analisadores hematológicos, o Advia 2120 (Siemens®), XE-2100 e XE-5000 (Sysmex®) realizam a quantificação direta dos fragmentos eritrocitários e fornecem tal contagem como um parâmetro de pesquisa. O primeiro utiliza na quantificação o canal de eritrócitos e plaquetas, no qual os esquistócitos correspondem às partículas com volume menor que 30 fL e com um índice de refração maior que 1,4. Esse valor de índice de refração possibilita a diferenciação dos esquistócitos das macroplaquetas, que utilizam o canal de reticulócitos, enquanto os esquistócitos são considerados, no citograma, como os menores eventos com baixo conteúdo de RNA (**Figura 2.16**).

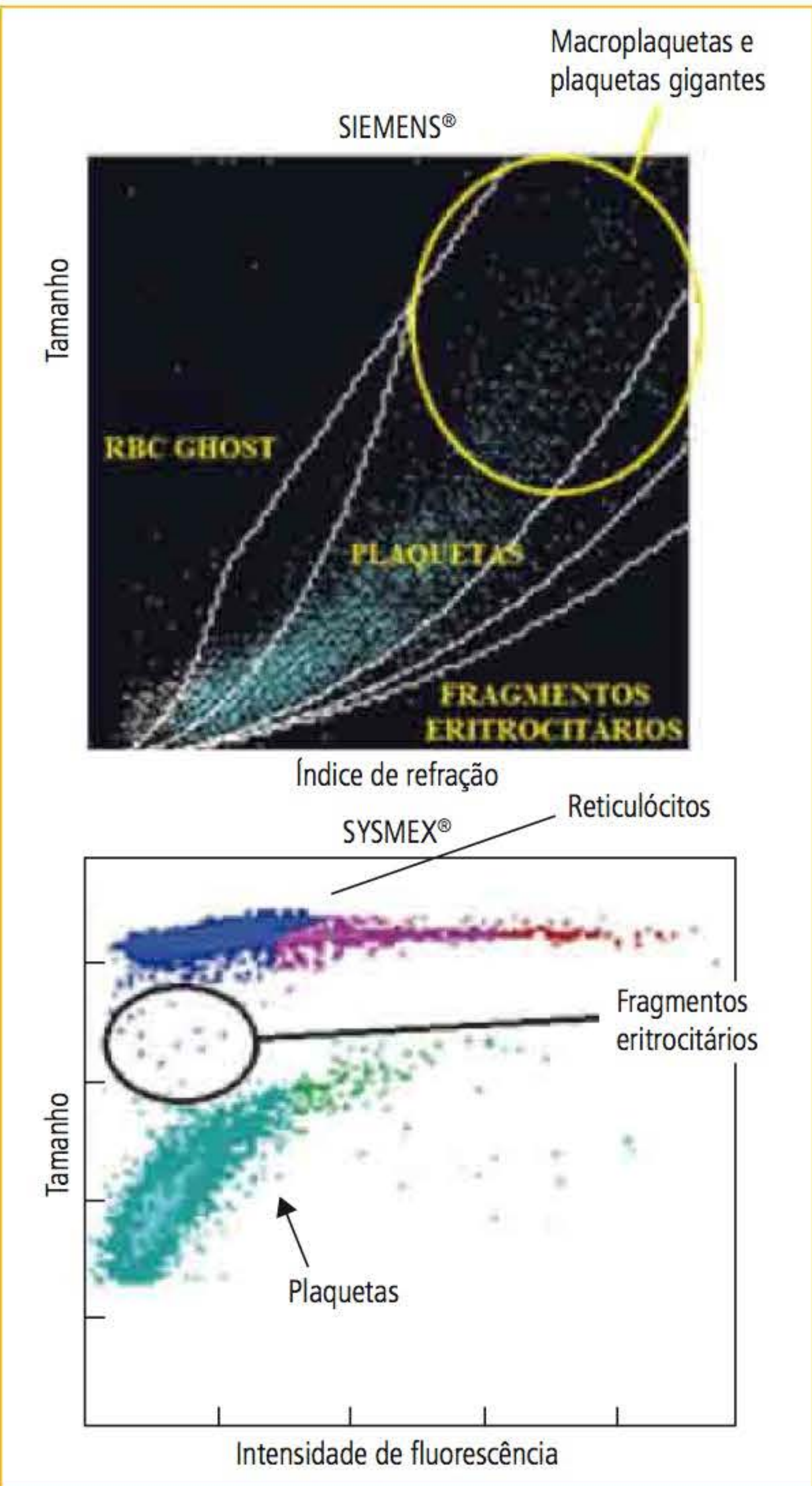
Em ambos os analisadores, os esquistócitos são identificados somente com base no tamanho e no conteúdo de hemoglobina, independentemente da sua forma. Portanto, outras partículas, tais como eritrócitos pequenos ou mesmo fragmentos de membrana, podem ser incluídos na contagem. Estudos publicados mostram uma boa correlação entre os métodos automatizados e os microscópicos. A imprecisão do método automatizado é menor que no método visual e é dependente da concentração.

A sensibilidade para o diagnóstico de microangiopatias depende do limiar de corte selecionado e é excelente (entre 91,8-100%); entretanto, de acordo com o tipo de analisador, a especificidade é baixa (20-52,2%).

Em consideração ao seu alto valor preditivo negativo, o método automatizado pode ser utilizado para triagem, quando clinicamente apropriado. Contudo, é necessário, para os resultados positivos, um exame microscópico para confirmar a presença de esquistócitos.

## PARÂMETROS DE VOLUME PLAQUETÁRIO

Os analisadores hematológicos fornecem a contagem de plaquetas e geram o volume plaquetário médio (VPM), o índice de variação do tamanho das plaquetas, conhecido como PDW (do inglês *platelet distribution width*), análogo ao RDW dos eritrócitos e o plaquetócrito (PCT), o qual indica a massa plaquetária e é análogo ao hematócrito.



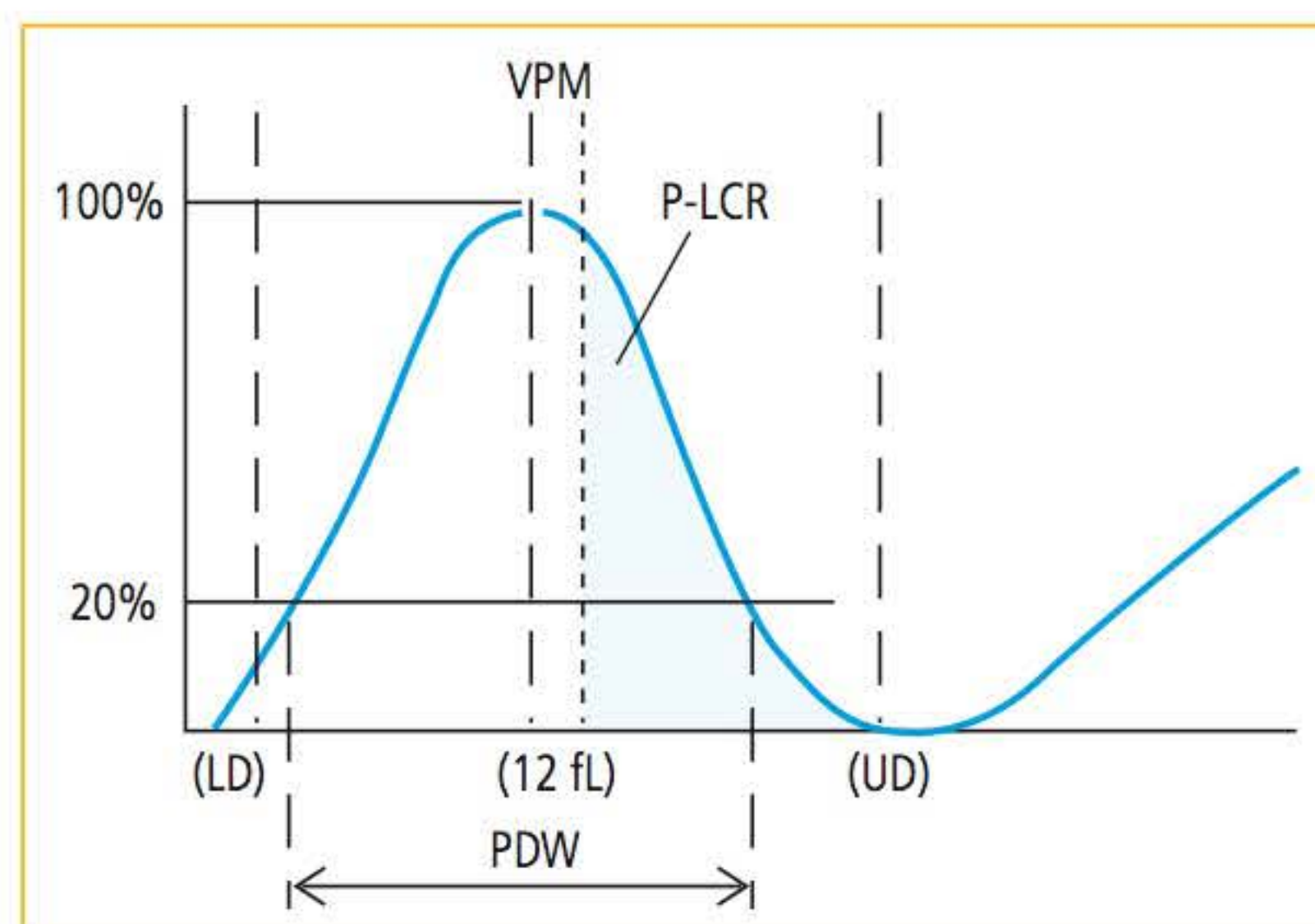
**FIGURA 2.16** Demonstração dos citogramas de obtenção de fragmentos eritrocitários em analisadores Siemens® e Sysmex®.

Fonte: Adaptada de Siemens Healthcare Diagnostics<sup>26</sup> e Briggs e colaboradores.<sup>42</sup>

Analisadores da marca Sysmex® fornecem, ainda, o P-LCR (*platelet large cell ratio*), que demonstra a proporção de plaquetas com volume superior a 12 fL em relação à contagem total de plaquetas, sendo útil na detecção de macroplaquetas, plaquetas gigantes e agregados plaquetários (**Figura 2.17**).

Os parâmetros de volume plaquetário são determinados por analisadores que utilizam o método da impedância ou o óptico. De posse dos dados relativos ao tamanho plaquetário, é gerado um histograma, que é uma curva de distribuição da frequência dos volumes plaquetários encontrados. Trata-se de uma curva de Gauss com distribuição do tipo *log normal*, que é utilizada para determinar o volume médio das plaquetas, assim como





**FIGURA 2.17** Histograma de volumes plaquetários e obtenção do VPM, PDW e P-LCR em analisadores Sysmex®.

Fonte: Adaptada de Sysmex.<sup>29</sup>

a amplitude de distribuição dos volumes plaquetários. O histograma de volume plaquetário é normalmente do tipo *right skewed* (tendenciosa para a direita), e variações dessa forma são anormais.<sup>43</sup>

Nos analisadores Siemens® Advia 120/2120, o PDW é expresso como o coeficiente de variação dos volumes, enquanto que nos Beckman Coulter®, o PDW equivale a uma relação matemática que utiliza o desvio-padrão geométrico do tamanho das plaquetas. Já nos analisadores hematológicos da linha Sysmex®, o PDW é obtido no nível de 20% de frequência do histograma plaquetário e é expresso em fL.

O PCT é calculado como o produto entre o VPM e a contagem de plaquetas e tem sido proposto como um indicador da massa das plaquetas. Nos contadores da linha Sysmex®, o PCT é determinado pelo número de plaquetas que passam por um orifício, com volume e tempo pré-definidos, método conhecido como empilhamento virtual. Já o VPM é calculado pelo quociente entre PCT e a contagem de plaquetas.

Em indivíduos saudáveis, há uma correlação não linear e inversa entre VPM e a concentração de plaquetas, sendo que o VPM tende a diminuir em indivíduos com altas contagens de plaquetas e a aumentar em contagens baixas. Essa relação é tal que a massa plaquetária, expressa pelo plaquetócrito ( $PCT = VPM \times \text{contagem de plaquetas}$ ), é relativamente constante dentro de um largo intervalo de contagens de plaquetas, resultando em ações hemostáticas equivalentes. Os valores de referência do VPM deveriam, portanto, ser ex-

pressos em função da concentração de plaquetas. Essa ampla dispersão dos valores normais limita o uso do VPM como um teste de triagem para condições clínicas caracterizadas por valores extremos, tais como trombocitopenias hereditárias.

Nas trombocitopenias adquiridas, um VPM aumentado evidencia uma produção aumentada das plaquetas e função megacariocítica normal como, por exemplo, púrpura trombocitopênica imunológica e coagulação intravascular disseminada, enquanto um VPM normal ou diminuído sugere um defeito na produção de plaquetas como na aplasia medular, leucemias agudas e quimioterapia.

O VPM também é útil para monitorar a recuperação da concentração de plaquetas nas trombocitopenias por ocorrer seu crescimento precoce quando a concentração de plaquetas começa a aumentar. Uma limitação para isso seria o fato de vários analisadores hematológicos não poderem, às vezes, fornecer o VPM nos casos de contagens de plaquetas extremamente baixas.

Tem sido demonstrado que o tabagismo aumenta o VPM em idosos com fatores de risco para aterosclerose. Duas hipóteses têm sido sugeridas para explicar o aumento do VPM: a primeira seria um aumento na produção de plaquetas grandes e hipergranulares pela medula óssea, enquanto na segunda ocorreria um aumento do consumo de plaquetas no local do infarto. Apesar de o VPM estar aumentado, ocorre uma redução de macroplaquetas no momento do infarto, sugerindo consumo de plaquetas maiores e hemostaticamente mais ativas. O tamanho das plaquetas é um marcador importante de morte por infarto do miocárdio em homens.<sup>44</sup> Aumentos anormais no PDW e diminuição na contagem de plaquetas podem ser características de estados pré-trombóticos em doenças coronarianas.

Grotto e Noronha<sup>45</sup> demonstraram que o P-LCR aumentou significativamente em pacientes com hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia quando comparados com grupos controles normais, sugerindo que plaquetas com diâmetro aumentado são mais reativas e podem contribuir para eventos vaso-oclusivos em pacientes com dislipidemias.

Em populações saudáveis, há uma relação direta entre VPM e PDW e essa relação é mantida na púrpura trombocitopênica idiopática e na leucemia mieloide crônica, nas quais ambos estão



aumentados. Esse fato não ocorre na anemia megaloblástica ou durante quimioterapia, quando o VPM diminui com o aumento do PDW. Um VPM baixo, acompanhado por uma contagem de plaquetas normal, alta ou baixa, é associado com doenças que causam danos à medula óssea, como, por exemplo, quimioterapia citotóxica e supressão da medula devido a uma septicemia.

O EDTA é o anticoagulante mais comumente utilizado para contagens celulares, mas altera a morfologia plaquetária, mudando a forma elíptica nativa para a forma de esferas com pseudópodes, e essa mudança ocorre imediatamente após a exposição ao anticoagulante. O EDTA também promove um aumento da concentração intracelular de AMP cíclico, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática e induzindo intumescência progressiva e diminuição da densidade óptica. Como consequência, o VPM aumenta em função do tempo de coleta, quando determinado por impedância, e diminui quando determinado por método óptico. De uma forma geral, o VPM pode aumentar mais de 30% dentro dos primeiros 5 minutos de exposição ao EDTA e aumentar mais 10 a 15% nas 2 horas subsequentes.

Como a metodologia tem um impacto significativo sobre a determinação do VPM, é imperativo que o anticoagulante utilizado, o tempo decorrido da coleta até a análise, a temperatura de armazenamento e a tecnologia empregada sejam especificados nos laudos de hemograma. Quando essas variáveis laboratoriais são padronizadas, estudos têm mostrado que o VPM é muito constante em função do tempo, com um coeficiente de variação menor que 4%.

Valores fora dos limites normais são indicativos de distúrbios da trombopoiese. Porém, se métodos não padronizados são empregados, a significância das alterações no VPM são questionáveis, e qualquer relação com estados patológicos pode ser obscura.

## ▄▄ CONTAGEM DE PLAQUETAS GIGANTES E DE AGREGADOS PLAQUETÁRIOS

O analisador hematológico Advia 120/2120 (Siemens® Diagnostics) fornece a contagem de plaquetas gigantes (LPLT, do inglês *large platelets*), com volume superior a 20 fL. Essa contagem deriva do citograma de dispersão de plaquetas e eritrócitos com base nos valores de índice de refração e volume, podendo estar aumentada em casos

de leucemia mieloide crônica, quimioterapia, pós-transplante de medula óssea e trombocitemia essencial. Tais analisadores também realizam a contagem automatizada de agregados plaquetários (PLT-CLM, do inglês *platelet clumps*), a qual pode estar relacionada com punções traumáticas e ainda ser útil na diferenciação entre pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA e trombocitopenias verdadeiras.

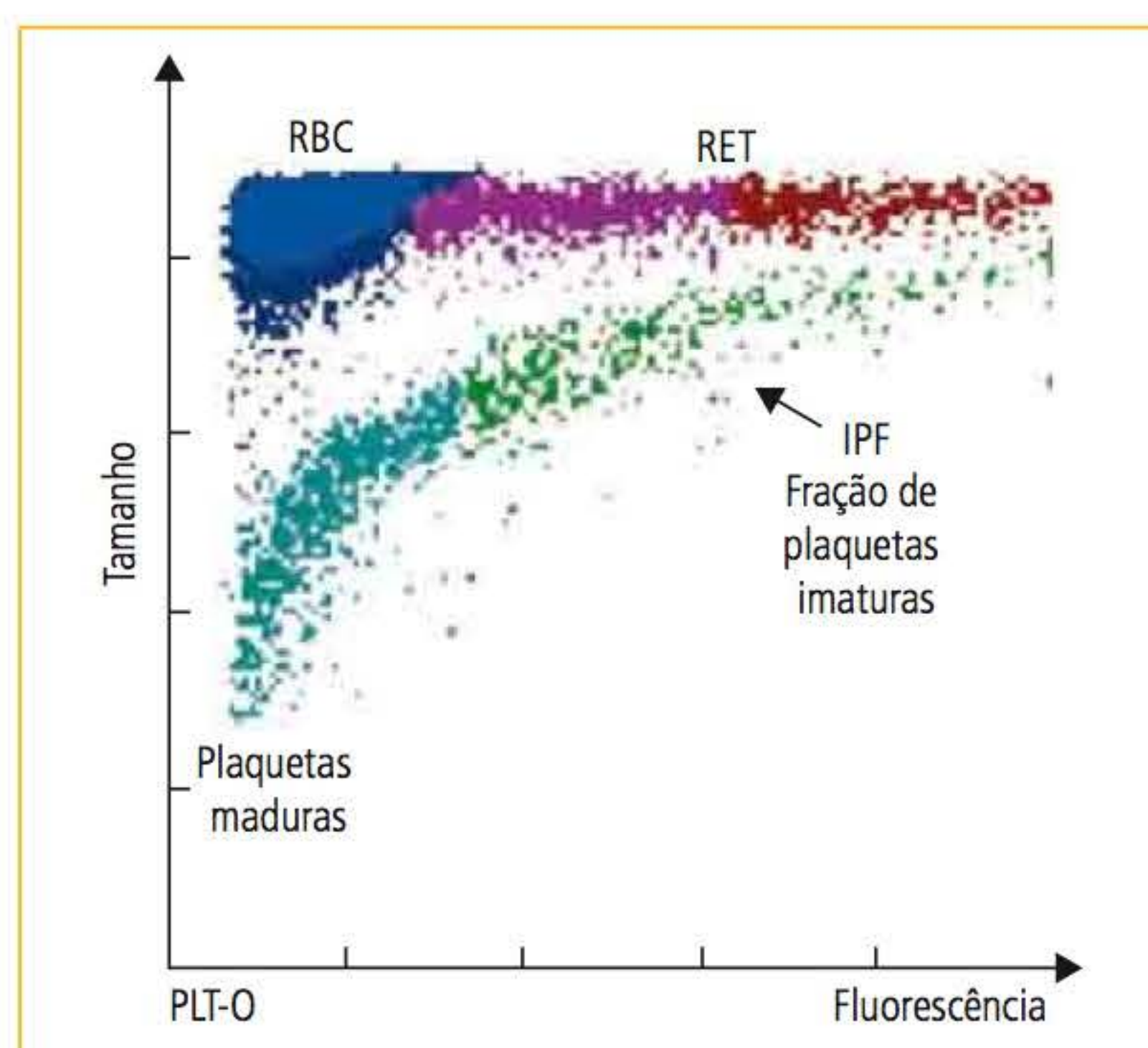
## ▄▄ PARÂMETROS DE MASSA PLAQUETÁRIA

Nos analisadores hematológicos Advia 120/2120 (Siemens® Diagnostics), a contagem de plaquetas é realizada por método óptico que determina o tamanho e o índice de refração das plaquetas conforme são contadas. Com essas informações, são gerados os seguintes parâmetros: concentração média dos componentes plaquetários (MPC, do inglês *mean platelet component*), expresso em g/dL, e a massa plaquetária média (MPM, do inglês *mean platelet mass*), expressa em picogramas. Uma redução no MPC pode ser utilizada para detectar ativação plaquetária na doença arterial coronariana, doença de Alzheimer, doenças mieloproliferativas e diabetes, bem como em situações em que a ativação das plaquetas ocorre *in vitro*, devido às condições da amostra no que se refere ao anticoagulante usado e às condições de estocagem. A determinação do MPC e MPM requer cuidados que garantam que a ativação das plaquetas não seja alterada *in vitro*.

## ▄▄ PLAQUETAS RETICULADAS E FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS

As plaquetas recém-liberadas na circulação são mais reativas que as plaquetas mais maduras e possuem maior conteúdo de RNA. Devido a essa similaridade com os reticulócitos, elas são chamadas de plaquetas reticuladas. O número de plaquetas reticuladas está relacionado com o grau de trombopoiese: aumenta com o aumento da produção e diminui quando a produção declina. Com o uso da citometria de fluxo e corantes fluorescentes que se ligam ao RNA, o analisador hematológico Sysmex® XE-5000 conta as plaquetas reticuladas (**Figura 2.18**), e os valores de referência publicados podem variar de menos de 3% a 20% do total de plaquetas.<sup>46</sup>





**FIGURA 2.18** Citograma que demonstra a obtenção da contagem de plaquetas reticuladas ou imaturas (IPF) em analisadores Sysmex®.

Fonte: Adaptada de Sysmex.<sup>27</sup>

Apesar de haver problemas relacionados à padronização da contagem de plaquetas reticuladas, como, por exemplo, a falta de controles comerciais, há um grande potencial para aplicações clínicas desse parâmetro para diagnóstico e tratamento. Ele pode ser utilizado para distinguir trombocitopenia, devido à destruição das plaquetas periféricas ou perda aguda de sangue, nas quais a porcentagem de plaquetas reticuladas está aumentada, das formas com insuficiência medular, como, por exemplo, aplasia e quimioterapia citotóxica, nas quais a porcentagem não é diferente daquelas das amostras normais.

O aumento das plaquetas reticuladas pode ser um indicador precoce da destruição plaquetária em pacientes com púrpura trombocitopênica imune ou púrpura trombocitopênica trombótica. Após seções de quimioterapia, o aumento de plaquetas reticuladas ocorre entre 1 e 3 dias antes do início da recuperação da concentração de plaquetas no sangue periférico. Esse parâmetro tem demonstrado ser mais útil que o VPM em prever recuperação medular. No transplante alogênico de medula óssea, o aumento na fração de plaquetas imaturas precede o aumento na contagem total de plaquetas em 4 a 4,5 dias. O fato de as plaquetas reticuladas predizerem a regeneração plaquetária torna possível reduzir transfusões profiláticas de plaquetas em pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou em quimioterapia.

A falta de padronização e a necessidade de analisadores hematológicos específicos têm limitado esse teste a poucos laboratórios.<sup>42</sup> O analisador hematológico Sysmex® XE-5000 é capaz de contar plaquetas reticuladas no canal de reticulócitos, indicando-as como porcentagem de plaquetas imaturas. A determinação desse parâmetro é estável em amostras coletadas em EDTA à temperatura ambiente por pelo menos 12 horas. A imprecisão é dependente da concentração e situa-se entre 4,9% e 22%; já os valores de referência para adultos saudáveis estão entre 1% e 8%.

## PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS

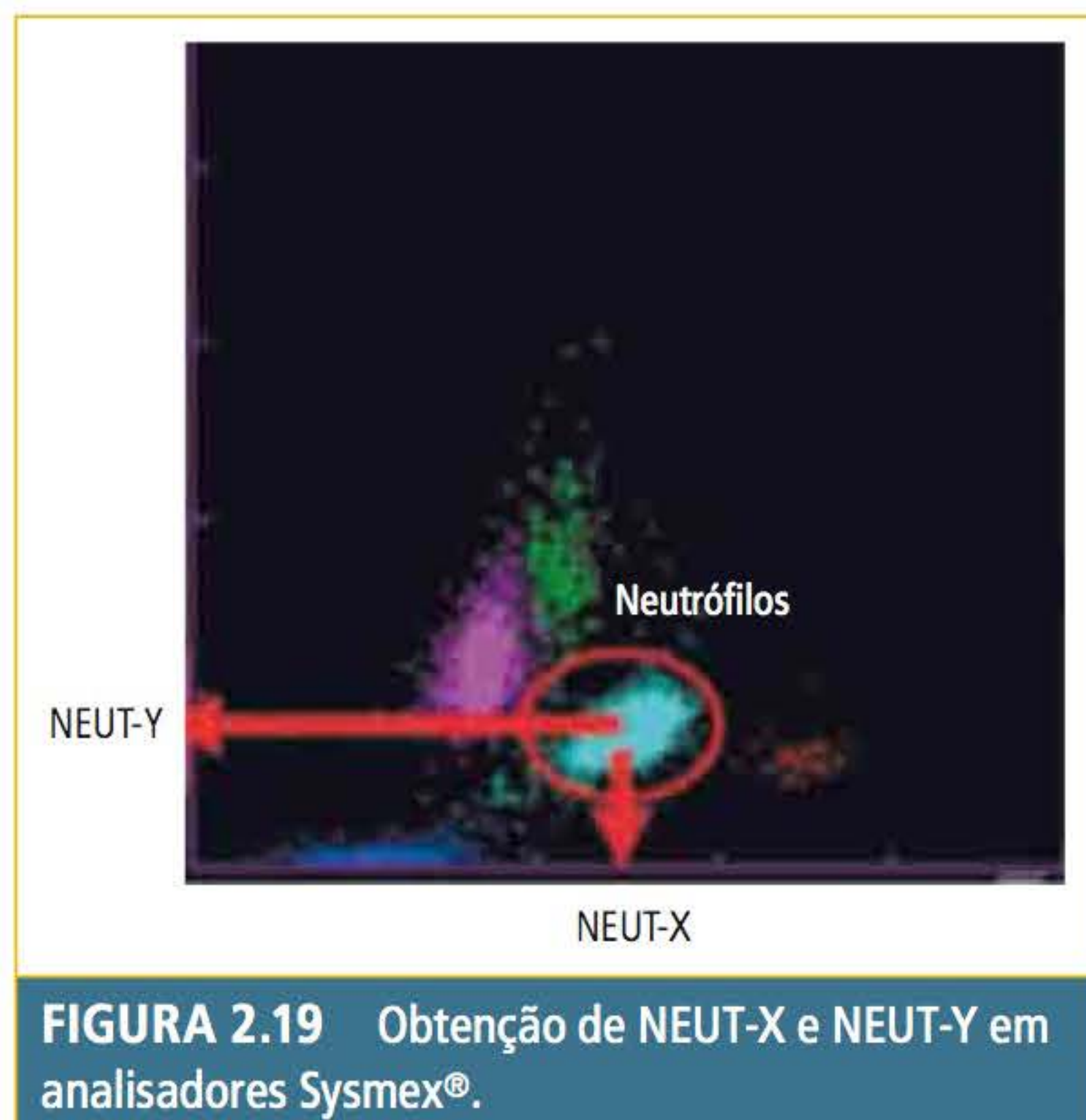
Os analisadores hematológicos Cell-Dyn 4000 e Cell-Dyn Sapphire (Abbott® Diagnostics) realizam a contagem diferencial de leucócitos utilizando princípio óptico (MAPSS, do inglês *multi angle polarized scatter separation*) e coloração fluorescente. Nessa contagem, é fornecido um parâmetro chamado de fração viável de leucócitos (WVF, do inglês *white blood cell viable fraction*), que separa os leucócitos íntegros dos leucócitos não viáveis, que estão velhos e degenerados. É um parâmetro útil na identificação de amostras envelhecidas que são enviadas ao laboratório, que podem ser liberadas com resultados duvidosos. Também se constitui um bom método para quantificar células apoptóticas, podendo ser útil para prever a resposta à quimioterapia e para avaliar o valor preditivo da indução da apoptose *in vitro* antes de começar um protocolo de quimioterapia.

Os modelos mais sofisticados de analisadores Coulter Counter® fornecem parâmetros posicionais dos leucócitos. Os dados posicionais definem cada população de leucócitos por meio de índices que indicam a média e o desvio-padrão do volume, da condutividade e do grau de dispersão da luz. Esses parâmetros têm sido úteis na formulação de regras para rastreamento de sepse, infecções virais, câncer metastático cervical, mielodisplasias, doenças linfoproliferativas e malária.

Os analisadores XE-2100, XE-5000 e XT-4000i (Sysmex®) fornecem um parâmetro chamado NEUT-X (VR = 1212 – 1413; não apresenta unidade) e outro chamado NEUT-Y (VR = 401 – 439), que são os valores médios da difração da população de neutrófilos e que representa a estrutura interna destas células (Figura 2.19). Valores baixos de NEUT-X e NEUT-Y se correlacionam com hipogranulação em neutrófilos e, quando considerados



conjuntamente com anemia, tornam-se altamente sugestivos de mielodisplasia. Em contrapartida, valores elevados de NEUT-X indicam alto conteúdo de grânulos nos neutrófilos e pode estar associado com estados infecciosos.



**FIGURA 2.19** Obtenção de NEUT-X e NEUT-Y em analisadores Sysmex®.

Fonte: Adaptada de Furundarena e colaboradores.<sup>47</sup>

Esses mesmos analisadores possuem a capacidade de separar os linfócitos com alta fluorescência dos demais, os quais estão correlacionados com plasmócitos e linfócitos atípicos em amostras de sangue periférico e líquidos biológicos e com células mesoteliais em líquidos biológicos.

Analisadores Siemens®, que utilizam reações citoquímicas para auxiliar na contagem diferencial de leucócitos, fornecem informações sobre a atividade da enzima peroxidase, expressa como o índice médio de atividade da peroxidase (MPXI, do inglês *mean peroxidase activity index*). Um MPXI elevado tem sido observado em infecções bacterianas e virais como Aids, mielodisplasias, leucemias e anemia megaloblástica. Já um MPXI diminuído pode ocorrer em deficiências hereditárias e adquiridas da peroxidase dos neutrófilos.

A maioria desses parâmetros leucocitários somente é utilizada no laboratório de hematologia, como ferramenta avançada para alertar possíveis doenças específicas ou condições clínicas. Contudo, a evolução das pesquisas em breve permitirá a criação de novos indicadores reportáveis de anormalidades.

## REFERÊNCIAS

1. Bain BJ. Blood cells: a practical guide. 4th ed. Oxford: Blackwell; 2006.
2. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. Dacie and Lewis practical haematology. 11th ed. China: Churchill Livingstone Elsevier; 2012.
3. Brown BA. Hematology: principles and Procedures. 6th ed. Malvern: Lea & Febiger; 1993.
4. Cartwright GE. Diagnostic laboratory hematology. 3rd ed. New York: Grune & Stratton; 1963.
5. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Proc Natl Electron Conf. 1956;12:1034-40.
6. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. Nature. 1953;171(4340):37-8.
7. England JM. Blood cell sizing. In: Koepke JA, editor. Practical laboratory hematology. New York: Churchill Livingstone; 1991.
8. Fujimoto K. Principles of measurement in hematology analyzers manufactured by Sysmex Corporation. Sysmex J Int. 1999;9(1):31-44.
9. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber D, et al. Wintrobe's clinical hematology. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
10. Groner W, Kanter R. Optical technology in blood cell counting. Sysmex J Int. 1999;9(1):21-30.
11. Groner W, Simson E. Practical guide to modern hematology analyzers. Chichester: John Wiley & Sons; 1995.
12. Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids: laboratory examination of cerebrospinal, seminal, serous & synovial fluids. 3rd ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists; 1992.
13. Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO. Williams: hematology. 7th ed. Nova York: McGraw-Hill Medical; 2007.
14. Okada T. Development and problem of automated hematology analyzer. Sysmex J Int. 1999;9(1):52-7.
15. Rowan RM, England JM. Automation and quality assurance in haematology. London: Blackwell Scientific; 1986.
16. Comar SR, Pasquini R. Bases técnicas do hemograma e suas aplicações. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, organizadores. Tratado de hematologia. São Paulo: Atheneu; 2013. p. 817-31.
17. Quintana M. Wallace H. Coulter, inventor, innovator [Internet]. Miami: Examiner.com; 2012 [capturado em 27 abr 2015]. Disponível em: <http://www.examiner.com/slide-show/wallace-h-coulter-inventor-innovator#slide=1>.
18. Tatsumi N, Tsuda I, Furota A, Takubo T, Hayashi M, Matsu-moto H. Principle of blood cell counter: development of electrical impedance method. Sysmex J Int. 1999;9(1):8-20.
19. Thom R, Hampe A, Sauerbrey G. Die elektronische volumenbestimmung von blutkörperchen und ihre fehlerquellen (The electronic volumetric measurement of blood particles and related source of errors). Z Gesa Exp Med. 1969;151(4):331-49.
20. DeNicola DB. Advances in hematology analyzers. Top Companion Anim Med. 2011;26(2):52-61.
21. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. Lab Hematol. 2005;11(2):83-90.
22. Hoffmann JJ, Hoedemakers RM. Diagnostic performance of the variant lymphocyte flag of the Abbott Cell-



- Dyn 4000 haematology analyser. Clin Lab Haematol. 2004;26(1):9-13.
23. Martinho MSC. O que é sensibilidade e especificidade na geração de alarmes pelos analisadores hematológicos (*flags*) e qual a importância? In: Martinho MSC. Hematologia em laboratório clínico. São Paulo: Sarvier; 2012.
  24. Rinder HM, Muns VJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. Arch Pathol Lab Med. 1993;117(6):606-10.
  25. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. Am J Clin Pathol. 2008;130(1):104-16.
  26. Siemens Healthcare Diagnostics. Operator's guide: ADVIA® 2120/2120i hematology systems. Tarrytown: Siemens; 2010.
  27. Sysmex. XE-5000™: sistema automatizado para hematologia. São José dos Pinhais: Sysmex; 2010.
  28. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. Int J Lab Hematol. 2009;31(3):277-97.
  29. Sysmex. XE-2100™: automated hematology system. São José dos Pinhais: Sysmex; 2011.
  30. Cornbleet PJ. Clinical utility of the band cell. Clin Lab Med. 2002;22(1):101-36.
  31. Houwen B. The differential cell count. Lab Hematol. 2001;7:89-100.
  32. Rümke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. Blood cells. 1985;11(2):311-4.
  33. Sakata T. Reagent characteristics in the XE-2100 NRBC channel. Sysmex J Int. 2000;10(1):41-6.
  34. Fraser CG, Petersen PH. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. Clin Chem. 1999;45(3):321-3.
  35. Heilmeyer L. Blutfarbstoffwechselstudien. Dtsch Arch Klein Med. 1931;171:123-53.
  36. Brecher G. New methylene blue as a reticulocyte stain. Am J Clin Pathol. 1949;19(9):895-6.
  37. Pierre RV. Reticulocytes: their usefulness and measurement in peripheral blood. Clin Lab Med. 2002;22(1):63-79.
  38. Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. Clin Chem Lab Med. 2010;48(10):1369-80.
  39. Riley RS, Ben-Ezra JM, Goel R, Tidwell A. Reticulocytes and reticulocytes enumeration. J Clin Lab Anal. 2001;15(5):267-94.
  40. Caporal FA, Comar SR. Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. J Bras Patol Med Lab. 2013;49(5):320-7.
  41. Walter JG, Garrity P. RDW-SD and RDW-CV: their relationship to RBC distribution curves and anisocytosis. Sysmex J Int. 1993;3(1):40-5.
  42. Briggs C, Kunda S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. Br J Haematol. 2004;126(1):93-9.
  43. Comar SR, Silva PH. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. Rev Bras Anal Clin. 2009;41(4):257-65.
  44. Kiliçli-Çamur N, Demirtunç R, Konuralp C, Eskiser A, Basaram Y. Could mean platelet volume be a predictive marker for acute myocardial infarction. Med Sci Monit. 2005;11(8):387-92.
  45. Grotto HZ, Noronha JF. Platelet large cell ratio (P-LCR) in patients with dyslipidemia. Clin Lab Haematol. 2004;26(5):347-9.
  46. Matic GB, Chapman SE, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. Cytometry. 1998;34(5):229-34.
  47. Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, Sainz MR, Agirre A, Trassorras M, et al. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. Int J Lab Hematol. 2010;32(3):360-6.

### Leituras sugeridas

- Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D, Machin SJ. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. J Clin Pathol. 2012;65(11):1024-30.
- Chapman M. Hematology analyzers offer new technology and user-friendliness. Lab Med. 2000;31(3):146-50.
- Comar SR, Danchura HSM, Silva PH. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(6):431-6.
- Gmür J, Burger J, Schans V, Fehr J, Schaffner A. Safety of stringent prophylactic platelet transfusions policy for patients with acute leukaemia. Lancet. 1991;338(8777):1223-6.
- Lehner J, Greve B, Cassens U. Automation in hematology. Transf Med Hemother. 2007;34:329-39.
- Longanbach S, Chapman DH, Miers MK. Automated cell-counting instrumentation. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. Hematology: clinical principles and applications. 4th ed. China: Elsevier Saunders; 2012.
- Pierre RV. Red cell morphology and the peripheral blood film. Clin Lab Med. 2002;22(1):25-61.
- Segal HC, Briggs C, Kunka S, Casbard A, Harrison P, Machin SJ, et al. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. Br J Haematol. 2005;128(4):520-5.
- Tubbs RR. Development of amplification-based molecular genetic testing in hematology. In: Marchant-Kottke K, Davis BH, editors. Laboratory hematology practice. Singapura: Blackwell; 2012.
- Van Assendelft OW, England JM. Advances in hematological methods: the blood count. Philadelphia: Boca Raton; 1982.
- Weerkamp F, Taal PH, De Boer BA. Left Shift 1+ flag for the detection of band neutrophils: interlaboratory variations and recommendations for the routine laboratory. Int J Lab Hematol. 2011;33(6):601-9.



FASE ANALÍTICA

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SANGUE PERIFÉRICO  
E SUA CORRELAÇÃO COM O HEMOGRAMA



A análise de uma extensão de sangue devidamente confeccionada e bem corada, com o auxílio de um microscópio óptico, é um dos exames mais eficientes para a avaliação e detecção de anormalidades dos componentes do sangue. A contagem de leucócitos e plaquetas pode ser estimada microscopicamente para verificação do resultado fornecido pelo analisador hematológico, a contagem diferencial de leucócitos pode ser obtida e a morfologia das séries vermelha e branca e das plaquetas pode ser avaliada quanto à presença de alterações. Apesar dos avanços da automação no laboratório de hematologia, ainda é necessária a presença de profissionais habilitados e experientes para verificar sistematicamente as lâminas selecionadas para revisão. Esse fato mantém a observação microscópica de uma extensão sanguínea como o cerne da identificação de anormalidades morfológicas do sangue.<sup>1</sup>

PREPARO DA EXTENSÃO SANGUÍNEA

Para que se possa confeccionar uma extensão sanguínea adequada, o primeiro cuidado que se deve ter é com a qualidade da lâmina que receberá a extensão. As lâminas de vidro ideais geralmente medem 75 mm de comprimento, 25 mm de largura e aproximadamente 1 mm de espessura. Devem ser transparentes, planas e livres de distorções, ranhuras e ondulações. Lâminas com as bordas chanfradas são mais seguras que as com bordas quadradas.<sup>2</sup> O **Quadro 3.1** mostra os tipos de lâminas que podem ser utilizadas para a confecção da extensão sanguínea.

QUADRO 3.1 Tipos de lâminas utilizadas para a confecção da extensão sanguínea		
LÂMINAS NOVAS		LÂMINAS REUTILIZADAS
LIMPAS	SUJAS	

Quando as lâminas novas são adquiridas no comércio, podem vir limpas ou sujas. As limpas geralmente têm um pedaço de papel de seda entre cada uma delas, enquanto as sujas não têm. As lâminas novas limpas devem ser colocadas em etanol absoluto por um período mínimo de 24 horas, com posterior secagem com pano limpo e armazenamento em caixas fechadas, e devem ser retiradas somente antes do uso.

As lâminas novas sujas devem ser imersas em solução detergente de uso laboratorial e, após, devem ser enxaguadas em água corrente. Enquanto a lâmina está sendo enxaguada, é possível observar se estão desengorduradas; caso estejam, a água escoará como uma película única por toda a extensão da lâmina. Posteriormente, as lâminas são colocadas em etanol absoluto por 24 horas e, após esse tempo, devem ser secas com pano limpo e seco e armazenadas em caixas fechadas para serem abertas somente antes do uso imediato. Este procedimento minimiza a formação de umidade.



As lâminas que serão reutilizadas (lâminas com extensão não corada, lâminas com extensão corada, com ou sem óleo de imersão) devem ser colocadas em solução detergente neutra e de uso laboratorial, na concentração determinada pelo fabricante, a quente (60 °C durante 30 minutos). Com uma esponja de louça macia, a extensão sanguínea deve ser retirada de cada lâmina; as lâminas devem ser enxaguadas e colocadas no detergente a frio e deixadas por 30 minutos. Posteriormente, devem ser lavadas em água corrente; se a água escoar como uma película única, significa que está desengordurada. Então, deve-se colocar as lâminas em etanol absoluto por 24 horas e, em seguida, secá-las com pano limpo; igualmente, as lâminas devem ser colocadas em caixas fechadas para serem abertas antes do uso imediato. A manipulação das lâminas deve ser feita sempre com luvas.

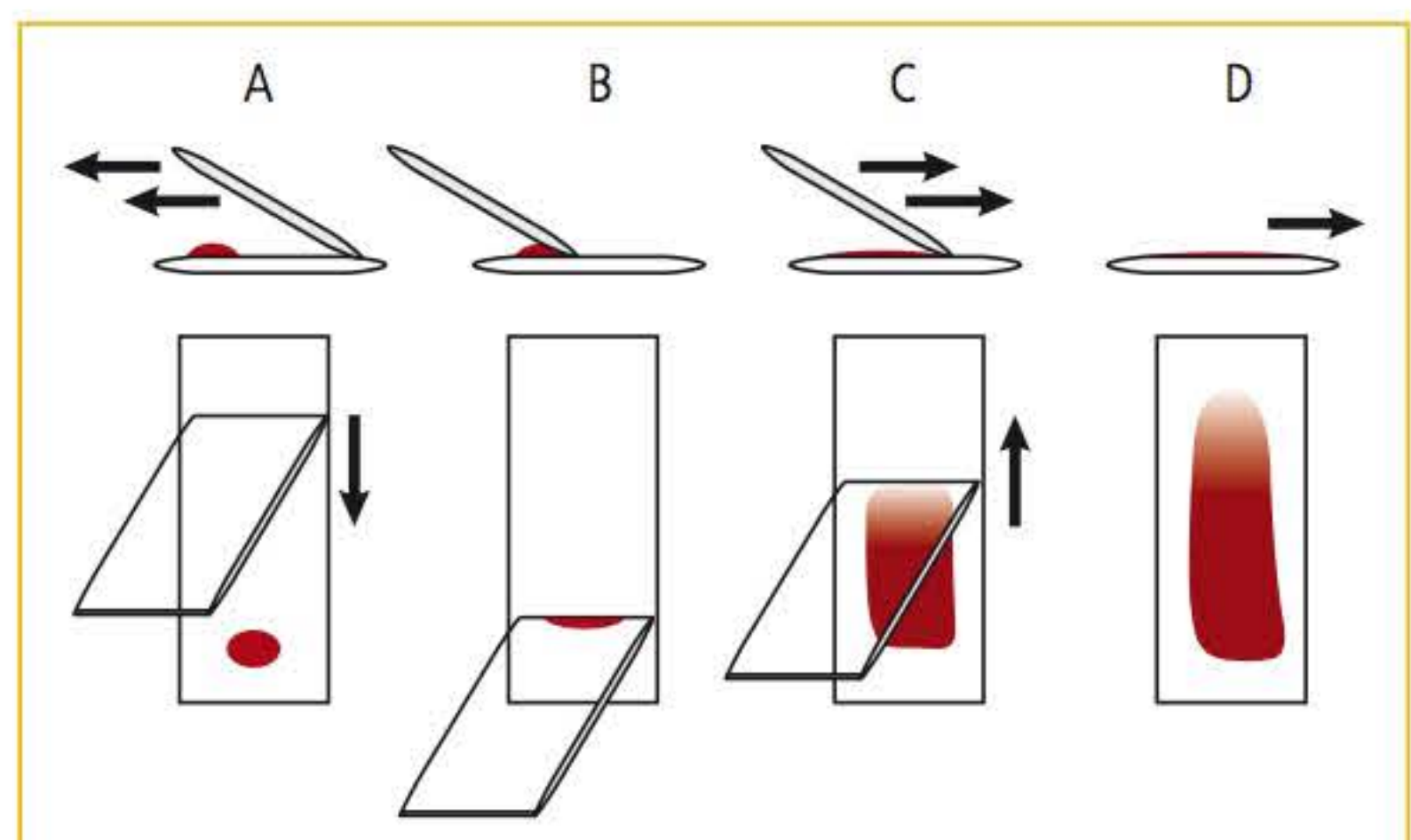
Para minimizar os efeitos da distribuição das células, recomenda-se utilizar extensoras um pouco mais estreitas que a lâmina de vidro, de modo que as partes laterais da extensão não se encostem nas bordas da lâmina de vidro. Na prática, uma segunda lâmina de vidro é frequentemente utilizada como extensora e esse procedimento é aceitável desde que a extensora, tenha bordas arredondadas e chanfradas. Uma boa extensora contribui muito para que se forme a “prainha” no final da extensão. Extensoras podem ser preparadas no próprio laboratório e, para isso, deve-se utilizar lâminas novas e lixar suas bordas com lixa d’água levemente molhada. As extensoras também podem ser adquiridas comercialmente, inclusive as de acrílico, que fornecem excelentes resultados. Caso a extensora tenha ranhuras na borda, o final da extensão terminará em prolongamentos tipo franja, o que dificulta a contagem diferencial. O documento H20-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>3</sup> descreve os requisitos mínimos para se obter extensões sanguíneas aceitáveis. Recomenda-se que ela tenha um comprimento de 2,5 a 4 cm, terminando a pelo menos 1 cm do final da lâmina de vidro.<sup>3</sup> O **Quadro 3.2** descreve os fatores que influenciam na qualidade das extensões sanguíneas.

O volume de sangue utilizado deve permitir uma confecção de uma extensão com espessura e comprimento adequados. Quanto maior a quantidade de sangue a ser estendida, mais grossa ficará a extensão e quanto menor a quantidade, mais fina.

A gota de sangue deve ficar em uma posição de aproximadamente 1 cm de um dos lados da lâmina. A lâmina extensora deve ser colocada na frente do sangue; posteriormente, puxa-se a extensora para trás e essa deve estar com toda a sua superfície encostada na lâmina. Quando a extensora tocar o sangue, deve-se esperar que ele se espalhe por capilaridade por toda a superfície de contato da extensora. Caso a distribuição do sangue não esteja igual por toda a extensora, deve-se, com um movimento delicado e sem levantar a extensora, movê-la para o lado esquerdo e o direito, para que o sangue se distribua uniformemente.<sup>4</sup> Quando essa situação for atingida, o movimento de extensão deve ser executado conforme **Figura 3.1**.

**QUADRO 3.2** Fatores que influenciam na qualidade das extensões sanguíneas

- Volume de sangue
- Posição em que é colocada a gota de sangue
- Qualidade da extensora
- Velocidade do movimento com a extensora
- Ângulo formado entre a extensora e a lâmina
- Suavidade e uniformidade no movimento
- Condições do paciente



**FIGURA 3.1** Procedimento de confecção de extensões sanguíneas.

A, colocar gota de sangue total na extremidade de uma lâmina de vidro; B, posicionar a borda de uma extensora, mantida a um ângulo entre 30 e 45°, sobre a gota de sangue até que ela se disperse por capilaridade; C, posicionar a lâmina em uma superfície plana ou segurar com as mãos e deslocar a extensora rápida e uniformemente para a outra extremidade da lâmina; D, a extensão sanguínea deve ter uma borda fina, em linha reta ou levemente arredondada.

A velocidade do movimento determina o comprimento da extensão: quanto mais rápida, mais curta ficará a extensão e vice-versa. O ângulo formado entre a extensora e a lâmina que receberá a extensão influencia também o comprimento da extensão: quanto menor, mais comprida e vice-versa.



A suavidade e a uniformidade no movimento determinam a qualidade da extensão; quando se imprime muita força, a extensora vai parando ao longo da extensão. As condições do paciente que influenciam no preparo e na qualidade das extensões são: anemia, policitemia, sangue de cordão, agregados plaquetários, crioaglutininas, anticorpos contra os eritrócitos na anemia hemolítica autoimune, formação intensa de *rouleaux* eritrocitário e amostra de recém-nascidos. Todos esses itens devem ser levados em conta quando se está fazendo extensões sanguíneas. Em uma extensão sanguínea bem feita, as células se distribuem aleatoriamente (ao acaso) e ao longo da mesma, conforme o seu tamanho. As células maiores, como neutrófilos e monócitos, tendem a ficar mais nas bordas da extensão e as menores, como os linfócitos, mais ao centro. Extensões malfeitas interferem na distribuição ao acaso das células e podem levar a erros nos resultados das contagens diferenciais e na avaliação morfológica das células sanguíneas.<sup>2,5-7</sup>

O ideal é que a extensão sanguínea seja confeccionada no momento da coleta e sem anticoagulante, mas bons resultados são obtidos com amostras em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) e preparadas dentro de 2 a 4 horas. Ocorrem alterações morfológicas significativas decorrentes do tempo e temperatura de armazenamento das extensões que dificultam o reconhecimento da morfologia celular. As amostras em EDTA devem ser sempre homogeneizadas após o armazenamento prolongado por um mínimo de 20 inversões completas de 180° ou homogeneizadas durante 5 minutos.

Para a avaliação plaquetária em lâmina, é preferível a extensão com anticoagulante, porque o EDTA evita a agregação plaquetária. Desse modo, as plaquetas distribuem-se isoladamente. Caso as extensões sanguíneas não sejam coradas no mesmo dia ou forem enviadas pelo correio para análise de outrem, o ideal é que elas sejam fixadas, e o melhor fixador é o álcool metílico. A fixação é feita colocando-se o metanol (em torno de 2,0 mL) sobre a lâmina durante 3 minutos seguidos de secagem ao ar.

As extensões sanguíneas também podem ser confeccionadas de modo automatizado com o emprego dos equipamentos extensores/coradores de lâminas. Os principais modelos existentes funcio-

nam acoplados aos analisadores hematológicos. Como exemplos, temos o SP-1000i *Automated Hematology Slide Preparation Unit* (Sysmex®, Japão), o Advia® AutoSlide Slide Maker Stainer (Siemens® Diagnostics, EUA) e o ABX SPS Evolution Slide Maker Stainer (Horiba Medical®, França). A automação do preparo de extensões sanguíneas possui vantagens em relação ao método manual em virtude da possibilidade de padronização do processo de confecção, de acordo com as preferências do laboratório.<sup>8</sup> Pode-se padronizar o volume de sangue depositado na lâmina, o tempo que a extensora encosta no sangue para que ocorra o espalhamento por capilaridade, a pressão da extensora sobre a lâmina, o ângulo e a velocidade do movimento de extensão, inclusive baseados no volume globular do paciente. Esse processo contribui para que as células sejam espalhadas da maneira mais aleatória possível, colaborando para uma maior manutenção da aparência morfológica. Todos esses fatores contribuem para diminuir o coeficiente de variação das contagens diferenciais manuais de leucócitos quando comparadas com as contagens diferenciais automatizadas. Outro fato importante é que a área de trabalho das lâminas confeccionadas de modo automatizado são maiores que as confeccionadas manualmente, facilitando o reconhecimento das células e aumentando a velocidade das contagens manuais, sobretudo, em situação com baixas contagens de leucócitos.<sup>9,10</sup>

### COLORAÇÃO DAS EXTENSÕES SANGÜÍNEAS

Em 1879, o médico alemão Paul Ehrlich foi quem, pela primeira vez, utilizou os corantes derivados da anilina para corar células sanguíneas. Classificou-os como ácidos, básicos e neutros, e as combinações desses corantes se tornaram a base para as colorações de Romanowsky, Giemsa, Wright e May-Grünwald. Dimitri Leonidovich Romanowsky modificou a técnica de Ehrlich usando uma mistura aquosa de eosina Y e azul de metileno oxidado e, a partir de então, todas as outras colorações desenvolvidas receberam a denominação de “derivadas de Romanowsky”. Por essa solução aquosa inicialmente desenvolvida não ser estável, James Homer Wright introduziu o uso do metanol como solvente e fixador prévio da coloração. Gustav Giemsa padronizou as soluções corantes e adicionou glicerol para aumentar sua solubilidade e estabilidade. Richard May e Ludwig Grünwald usaram soluções



saturadas para aumentar a intensidade de coloração das células. Atualmente, as extensões de sangue periférico coradas com Wright ou May-Grünwald Giemsa são as mais utilizadas no Brasil, sobretudo, por exibirem inigualável beleza e poder de discriminação das formas e cores das células sanguíneas.<sup>11-13</sup>

Os corantes de Romanowsky são misturas de sais ácidos (eosina) e sais básicos (azul de metileno e produtos derivados da oxidação do azul de metileno, como os azures de metileno). A eosina-azul de metileno tem afinidade por estruturas celulares citoplasmáticas ácidas ou básicas, e os corantes eosina-azur-azul de metileno apresentam afinidade por componentes citoplasmáticos e nucleares. Os corantes hematológicos podem ser divididos em corantes tradicionais e corantes rápidos. O **Quadro 3.3** mostra os tipos de corantes hematológicos.

QUADRO 3.3 Tipos de corantes hematológicos	
TRADICIONAIS	RÁPIDOS
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ May-Grünwald Giemsa</li><li>▪ Wright</li><li>▪ Leishman</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Baseados no método de Field</li></ul>

COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE MAY-GRÜNWALD GIEMSA

Preparo dos reagentes

**MAY-GRÜNWALD** – É uma mistura de eosina e azul de metileno (não oxidados), que quimicamente se transforma em eosinato de azul de metileno.

Dissolve-se 0,3 gramas do sal em 100 mL de metanol. Deixa-se o corante “envelhecer” em local fresco e escuro, em frasco âmbar durante 7 dias, homogeneizando-o diariamente. Após esse tempo, o corante está pronto para uso.

**GIEMSA** – É uma mistura de azur II (mistura equimolar de azul I e azul de metileno) e eosinato de azur II (corante formado pela combinação equimolar de azur I, azul de metileno e eosina amarelada).

Dissolve-se 1 grama do sal em 66 mL de glicérol, deixa-se em banho-maria a 56 °C, durante 2 horas, homogeneizando-o periodicamente com auxílio de um bastão de vidro. Após esse tempo, deixa-se a solução adquirir a temperatura ambiente e adiciona-se 66 mL de metanol. Coloca-se a solução corante em frasco âmbar, deixa-se em local fresco e escuro durante 7 dias e, neste período,

homogeneiza-se o corante diariamente. Filtra-se antes do uso. Essa é uma solução estoque e, para o uso, o corante deve ser diluído do seguinte modo: 1 gota do corante estoque concentrado para cada mL de água ou solução tampão. Para corar lâminas de líquidos biológicos, incluindo líquido, recomenda-se diluir 2 gotas do corante concentrado para cada mL de água ou solução tampão.

Solução tampão ou água

Quando se utiliza solução tampão, esta deve ser composta de uma mistura de fosfatos. O tampão fosfato pode ser preparado com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> na concentração de 0,067M, ou seja, preparam-se duas soluções aquosas, a primeira com 9,1 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e a segunda com 9,5 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Para se obter o pH desejado, as duas soluções devem ser misturadas do modo indicado na **Tabela 3.1**.

TABELA 3.1 Composição da solução tampão para diversos pH		
pH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mL)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL)
5,2	98,2	1,8
6,4	73,0	27,0
6,8	50,8	49,2
7,2	28,0	72,0

Outra opção de preparo de tampão é utilizar a fórmula descrita na **Tabela 3.2**. A azida sódica é um conservante do tampão. Caso não haja possibilidade de preparo de uma solução tampão, pode-se utilizar água de torneira, água recém-deionizada ou fazer uma mistura de ¾ de água de torneira com ¼ de água recém-deionizada (o pH deve ser medido e corrigido). Em laboratórios que tenham água obtida por osmose reversa, a mesma pode ser utilizada e, em geral, a coloração fica com boa qualidade. Pode-se utilizar ainda água mineral comercial que tenha no rótulo o valor do pH.

TABELA 3.2 Opção alternativa de preparo do tampão pH 6,8	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g
Azida sódica	0,5 g
Água deionizada q.s.p.	1.000 mL



### Técnica de coloração

1. Sobre a lâmina, colocar 2 mL do corante de May-Grünwald. Deixar entre 3 e 4 minutos.
2. Sem retirar o May-Grünwald, adicionar 2 mL de solução tampão ou água sem derramar o corante. Deixar 1 minuto.
3. Desprezar a solução corante-tampão ou água.
4. Adicionar 2 mL do corante de Giemsa (diluído para uso). Deixar entre 15 a 20 minutos.
5. Lavar a lâmina em água corrente, limpar a parte de trás para retirar restos de corante. Deixar secar ao ar e então a lâmina estará pronta para a leitura.

### Comentários

Quando o May-Grünwald é colocado sobre a lâmina, ele faz a fixação da extensão; por essa razão o tempo do corante é crítico. O May-Grünwald é solubilizado em metanol que, com o passar do tempo, evapora, fazendo com que o corante precipite. Quando a solução tampão ou a água são colocadas sobre o May-Grünwald, há uma inversão da fase alcoólica para a aquosa, ressaltando aspectos da coloração e ambientando a lâmina para receber o Giemsa em solução aquosa. O tempo também é crítico porque ocorre precipitação do corante na inversão da fase.

Os corantes ácidos (eosina) têm afinidade por estruturas celulares básicas, e os básicos (azul e azules de metileno), por estruturas celulares ácidas. O pH da solução tampão ou água é muito importante. Em pH neutro, os corantes atuam na estrutura celular pela qual têm afinidade. Quando o pH está ácido, há favorecimento da ação da eosina, e a coloração torna-se avermelhada, dependendo da acidez da solução tampão ou água. Em pH alcalino, a coloração torna-se basofílica, com intensidade de azul proporcional ao aumento do pH. O corante de Giemsa, por ser diluído em solução tampão ou água, também sofre influência do pH, mas o tempo da coloração não é crítico. Ambos os corantes de May-Grünwald e Giemsa possuem afinidade distintas pelas estruturas citoplasmáticas e nucleares.

A coloração com o May-Grünwald Giemsa pode ser feita em cubas e berços. Na primeira cuba, coloca-se o corante de May-Grünwald, na segunda uma mistura de May-Grünwald e água ou tampão em quantidades iguais e, na terceira, o corante de Giemsa (diluído para uso). Geralmente, o Giemsa diluído deve ser trocado em intervalos de 4 horas, pois, com o passar do tempo, essa

solução perde a estabilidade e pode produzir lâminas com fraca intensidade de coloração. O May-Grünwald pode ser somente completado, desde que seja sempre mantido em recipiente fechado para evitar a evaporação do metanol.

O May-Grünwald e o Giemsa podem ser preparados em um único corante, chamado de corante de Rosenfeld,<sup>14</sup> preparado com 1,1 grama do May-Grünwald e 2 gramas do Giemsa diluídos em 1.350 mL de metanol. A técnica de coloração é a mesma utilizada para os corantes de Leishman e Wright. Os cuidados com a água ou tampão utilizados são os mesmos que os descritos para a técnica de May-Grünwald Giemsa.

### COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE WRIGHT

#### Preparo dos reagentes

**WRIGHT** – É uma mistura dos derivados do azul de metileno com sais de eosina-azul de metileno.

Dissolve-se 3 gramas do corante em 100 mL de glicerol. Após a dissolução, completa-se o volume da solução para 1.000 mL com metanol. Deixa-se o corante “envelhecer” em frasco âmbar, em local escuro e fresco durante 7 dias, homogeneizando-o diariamente.

#### Técnica de coloração

1. Sobre a lâmina, colocar o corante de Wright, cobrindo-a totalmente. Em geral, são necessários 2 mL do corante. Deixar entre 3 e 4 minutos.
2. Sem retirar o Wright, adicionar igual quantidade de solução tampão ou água sem derramar o corante. Deixar de 10 a 15 minutos.
3. Lavar a lâmina em água corrente, limpando a parte de trás, para retirar restos de corante. Deixar secar ao ar e então a lâmina estará pronta para a leitura.

### Comentários

O tempo que o corante fica sobre a lâmina e o tempo da mistura corante-solução-tampão ou água devem ser estabelecidos pelo profissional que realiza a contagem diferencial. Os tempos acima foram sugeridos, pois, de um modo geral, são os mais utilizados na rotina laboratorial. Todos os aspectos relacionados com a solução tampão ou água que foram descritos para o corante de May-Grünwald Giemsa são válidos para o corante de Wright. A coloração pelo corante de Wright também pode ser feita em cuba: na primeira, coloca-se o corante de Wright e, na segunda, uma mistura



em partes iguais de corante e água ou tampão. O laboratório deve estabelecer o tempo em que as soluções devem ser trocadas.

## :: COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE LEISHMAN

### Preparo dos reagentes

**LEISHMAN** – É uma mistura dos derivados do azul de metileno com sais de eosina-azul de metileno.

Dissolve-se 0,2 gramas do corante de Leishman em 100 mL de metanol. Deixa-se o corante “envelhecer” em frasco âmbar, em local escuro e fresco durante 7 dias, homogeneizando-o diariamente.

### Técnica de coloração

1. Sobre a lâmina, colocar o corante de Leishman, cobrindo-a totalmente. Em geral, são necessários 2 mL do corante. Deixar entre 3 e 4 minutos.
2. Sem retirar o Leishman, adicionar igual quantidade de solução tampão ou água sem derramar o corante. Deixar de 10 a 15 minutos.
3. Lavar a lâmina em água corrente, limpando a parte de trás, para retirar restos de corante. Deixar secar ao ar e então a lâmina estará pronta para a leitura.

### Comentários

O tempo que o corante fica sobre a lâmina e o tempo da mistura corante-solução-tampão ou água devem ser estabelecidos pelo profissional que realiza a contagem diferencial. Os tempos acima foram sugeridos, pois, de um modo geral, são os mais utilizados na rotina laboratorial. Todos os aspectos relacionados com a solução-tampão ou água que foram descritos para a coloração de May-Grünwald Giemsa são válidos para o corante de Leishman. A coloração pelo corante de Leishman também pode ser feita em cuba: na primeira, coloca-se o corante de Leishman e, na segunda, uma mistura em partes iguais de corante e água ou tampão. O laboratório deve estabelecer o tempo em que as soluções devem ser trocadas.

## :: CORANTES RÁPIDOS

Os corantes rápidos são baseados no método de Field,<sup>5</sup> que tinha como objetivo fazer uma coloração rápida nas preparações de gota espessa para a pesquisa do *Plasmodium spp.* Esses corantes foram adaptados para a coloração de extensões sanguíneas, sendo compostos de três corantes: o corante 1 é à base de metanol e tem a finalidade de fixar as extensões; o corante 2 é à base de eosina e

tem a finalidade de fazer a coloração citoplasmática; e o corante 3, à base de azul de metileno ou dos azules de metileno, tem a finalidade de fazer a coloração de estruturas nucleares.

A coloração rápida tem sido muito usada pela dificuldade de se obter uma água adequada para a coloração com os corantes tradicionais, pois o corante rápido não depende do pH da água. Outro motivo para o uso da coloração rápida é o tempo. Os corantes tradicionais levam, em média, de 15 a 20 minutos para a coloração de uma lâmina; já na coloração rápida, o tempo não ultrapassa 1 minuto. Uma situação bastante comum é aquela em que se coram as lâminas executando mergulhos nas soluções corantes sem que haja marcação do tempo. Para uma coloração adequada, deve haver marcação de tempo, e a sugestão que se faz é que a coloração seja realizada em cubas e que a solução corante cubra todas as lâminas.

O que deve ser entendido a respeito dos corantes rápidos é que eles são limitados quanto à capacidade de fornecer informações mais detalhadas sobre a disposição da cromatina e de revelar detalhes de estruturas citoplasmáticas e nucleares. A coloração rápida pode ser bastante adequada, desde que seja realizada com rigor técnico. Os laboratórios podem utilizar a coloração rápida em muitas situações. Contudo, quando na extensão sanguínea houver a presença de células jovens ou alterações morfológicas, as lâminas devem ser sempre coradas com corantes tradicionais para confirmação de tais alterações.

### Técnica de coloração

1. Colocar o berço com as lâminas no corante 1 e deixar por 10 segundos. Durante esse tempo, nenhum movimento deve ser executado.
2. Retirar o berço do corante 1 e deixar escorrer por 5 segundos.
3. Colocar o berço no corante 2 e deixar por 10 segundos. Durante esse tempo, nenhum movimento deve ser executado.
4. Retirar o berço do corante 2 e deixar escorrer por 5 segundos.
5. Colocar o berço no corante 3 e deixar por 20 segundos. Durante esse tempo, nenhum movimento deve ser executado.
6. Retirar o berço do corante 3, deixar escorrer por 5 segundos e lavar em água corrente.



## Comentários

O tempo de coloração deve ser padronizado e cronometrado para que todas as lâminas tenham a mesma qualidade de coloração, não importando quem as core. Quando o tempo não é marcado, não há padronização da coloração no laboratório. Os tempos podem ser modificados conforme a preferência tintorial, mas uma vez estabelecido o tempo ideal para o laboratório, esse deve ser seguido por todos. O corante 1 é à base de metanol e possui a função de fixar as lâminas, mas cuidados devem ser tomados para que não evapore. O corante 2 e o 3, diferentemente do corante 1, não devem ser completados e sim trocados, e o laboratório deve estabelecer o tempo em que as soluções 2 e 3 devem ser trocadas, o que varia em função do número de lâminas coradas diariamente. O corante 3 pode formar um sedimento no fundo do frasco e, por esse motivo, é aconselhável que, antes de colocar o corante na cuba, ele seja homogeneizado. Antes de se iniciar a coloração, o corante 3, que está na cuba, também deve ser homogeneizado com auxílio de um bastão de vidro. Para colorações (corantes tradicionais ou rápidos) realizadas com cuba e berço, antes de se iniciar a coloração, o berço deve estar completamente seco; caso não esteja, os eritrócitos podem sofrer crenações e até hemólise.

### REQUISITOS PARA UMA COLORAÇÃO ADEQUADA

Aperfeiçoamentos tecnológicos da indústria química aumentaram a disponibilidade de corantes comerciais hematológicos, do tipo Romanowsky, de boa qualidade. Ainda assim, existem no mercado corantes hematológicos com considerável variação em sua composição química, estabilidade e reatividade, cabendo aos profissionais do laboratório identificar bons corantes, comparar marcas, considerando o equilíbrio entre custo e qualidade, bem como padronizar os procedimentos de coloração de rotina e controlar a qualidade dos mesmos. O documento H32-P do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) propõe uma padronização para as colorações hematológicas de Romanowsky com o emprego de sais com elevado grau de pureza.<sup>15</sup> Os resultados são muito satisfatórios, mas em função do elevado custo, a implantação torna-se impossibilitada na maioria dos laboratórios.

O controle de qualidade dos corantes hematológicos caminha lado a lado com o controle de

qualidade da confecção das extensões, haja vista essa última impactar diretamente sobre a qualidade das colorações. Portanto, somente partindo-se do pressuposto que uma extensão foi devidamente confeccionada, preferencialmente seguindo as diretrizes do documento H20-A2 do CLSI,<sup>3</sup> é que as conjecturas relativas à qualidade da coloração serão válidas em termos de requisitos mínimos para aceitabilidade. A qualidade das colorações é um componente fundamental para que uma lâmina seja satisfatória para a análise microscópica visual.

Em locais que realizam as colorações hematológicas de maneira manual, os profissionais envolvidos devem ter o devido treinamento e, quando necessário, reciclagem e educação continuada devem ser ofertadas à equipe para garantir qualidade e consistência suficiente no preparo e na coloração das extensões sanguíneas. Em ambientes automatizados e semiautomatizados, a equipe laboratorial deve ser devidamente treinada para operar os equipamentos, e os registros das manutenções dos mesmos devem ser utilizados e atualizados diariamente.<sup>16</sup>

Os melhores resultados em relação à coloração são obtidos em extensões recém-confeccionadas, em virtude de o sangue fresco agir como um tampão no processo de coloração. Extensões coradas após uma semana ou mais adquirem coloração azulada intensa.

Uma vez que os corantes e tampões são selecionados, o laboratório determina os tempos ideais, segundo suas exigências, para que seja produzida uma coloração desejável para as plaquetas, eritrócitos e leucócitos. Geralmente, é de comum acordo que uma extensão sanguínea bem corada mostre eritrócitos com tonalidade rosa salmão, linfócitos e neutrófilos com núcleo com coloração púrpura intensa e monócitos com núcleos corados em púrpura mais leve. As plaquetas devem apresentar coloração púrpura intensa, e os grânulos plaquetários devem ser visualizados. O citoplasma dos leucócitos deve estar corado da seguinte forma: neutrófilos com coloração rosa claro com grânulos secundários na cor lilás, monócitos com coloração azul acinzentado com grânulos finos e avermelhados e linfócitos com citoplasma apresentando vários tons de azul. Os grânulos azurófilos dos linfócitos e dos monócitos devem ser visualizados perante a basofilia citoplasmática que os circundam, e isso constitui um bom indicador da



qualidade da coloração. Os citoplasmas dos eosinófilos e dos basófilos também são bons marcadores da qualidade da coloração, porque os primeiros têm afinidade por corantes ácidos, e os basófilos, por corantes básicos. As granulações secundárias dos eosinófilos devem se corar em laranja vivo e a dos basófilos em preto.<sup>5</sup>

Também é imperativo que uma coloração hematológica de qualidade core adequadamente as inclusões celulares características dos eritrócitos e dos leucócitos que são encontradas em determinados estados patológicos para alertar o profissional do laboratório no sentido de realizar uma revisão mais aprofundada da lâmina do paciente em questão e, até mesmo, para consultar o histórico de resultados anteriores.

Sugere-se que, diariamente, assim que a bateria de coloração seja preparada, duas extensões sanguíneas sejam coradas e avaliadas, conforme as informações descritas acima, para então validar o início da rotina normal. O processo de implementação e otimização da coloração pode levar dias para ser ajustado às necessidades do laboratório, e as variáveis chave que possuem efeito marcante nesse processo são: escolha do corante e tampão, tempo de coloração para os corantes e o tampão, pH da água de lavagem, limpeza das lâminas e, conforme o caso, dos cassetes dos coradores automatizados e, principalmente, obtenção de consenso entre os profissionais do laboratório sobre a qualidade a ser alcançada pelo processo de coloração.<sup>8,17</sup> O **Quadro 3.4** mostra situações que favorecem a coloração ácida e a básica.

QUADRO 3.4 Situações que favorecem as colorações ácidas e básicas
COLORAÇÃO AVERMELHADA OU VERMELHA (pH ÁCIDO)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ pH da água ou tampão abaixo de 6,8-6,4</li><li>▪ Tempo de coloração não está correto (insuficiente)</li><li>▪ Coloração hematológica próxima ou na mesma cuba que a coloração bacteriológica</li><li>▪ Água de lavagem ácida</li><li>▪ Amostra heparinizada</li></ul>
COLORAÇÃO AZULADA OU DE AZUL INTENSO (pH ALCALINO)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ pH da água ou tampão acima de 6,4-6,8</li><li>▪ Tempo de coloração não está correto (prolongado)</li><li>▪ Água de lavagem básica</li><li>▪ Extensões “velhas”</li><li>▪ Presença de grandes quantidades de imunoglobulinas</li></ul>

ARTEFATOS DO PREPARO DE EXTENSÕES SANGUÍNEAS

Os artefatos decorrentes do preparo das extensões, tanto manuais como automatizadas, podem ocorrer devido a falhas técnicas na confecção da extensão, secagem lenta em condições de umidade, fixação insuficiente ou tardia e contaminação dos fixadores e corantes com água. Alguns tipos celulares podem ser danificados no preparo da extensão, especialmente os linfócitos da leucemia linfocítica crônica (LLC) e os blastos das leucemias agudas.<sup>18</sup> A **Tabela 3.3** mostra as situações mais comuns que provocam artefatos no preparo das extensões e faz recomendações para a correção do problema.

AVALIAÇÃO DA LÂMINA

:: AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica da lâmina pode fornecer indicativos da alteração que será observada na microscopia ou do resultado da contagem a ser verificada. Uma extensão de sangue que é mais azulada que o normal pode sugerir a presença de determinadas proteínas no plasma, como no mieloma múltiplo, e o *rouleaux* pode ser visto na microscopia. Uma extensão com aparência granular pode indicar presença de aglutinação eritrocitária, evidenciando a presença de crioaglutininas. Buracos na extensão podem significar que o paciente tem hiperlipidemia e que os parâmetros de série vermelha devem ser revisados quanto a possível interferência da lipemia. Contagens de leucócitos e de plaquetas extremamente altas podem ser detectadas por meio de presença de pontinhos azuis nos arredores da cauda da extensão. Extensões extremamente finas e com tonalidade clara podem sugerir uma amostra anêmica. Portanto, valiosas observações podem ser obtidas antes da análise microscópica.<sup>6</sup>

:: AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Uma avaliação inicial da lâmina corada com baixo aumento (x100) permite acessar a qualidade da extensão sanguínea em relação à distribuição das células, tamanho da área de trabalho, formação de *rouleaux* e aglutinação, qualidade da coloração e área ideal para avaliação dos detalhes morfológicos. As bordas podem conter acúmulo de leucócitos, agregados plaquetários e filamentos de fibrina, os quais indicam necessidade de



TABELA 3.3   Artefatos que podem ocorrer no preparo das extensões sanguíneas		
ARTEFATO	CAUSA	AÇÃO CORRETIVA/PREVENÇÃO
Eritrócitos refringentes	Fixação inadequada com metanol. Excesso de umidade. Coloração contaminada com água	Confeccionar outra extensão. Secá-la bem. Renovar corantes
Restos nucleares	Linfócitos frágeis como os da LLC se rompem e os núcleos ficam expostos na extensão	Adicionar 1 gota de albumina 22% ou plasma pobre em plaquetas a 5 gotas de sangue. Homogeneizar e confeccionar a extensão
Vacúolos em monócitos e neutrófilos. Cariopícnose e cariorréxis	Exposição prolongada ao EDTA	Sempre preparar as extensões dentro de 4 horas
Precipitados de corantes	Tempo de coloração aumentado. Corante em excesso	Limpar cubas, berços, tubulações, linhas de coloração e crostas de corantes com metanol
Leucócitos fracamente corados em amostras com contagens leucocitárias bastante elevadas	Muitas células para serem coradas utilizando os procedimentos habituais	Corar a lâmina novamente. A segunda coloração acentua o tom dos leucócitos
Eritrócitos muito avermelhados ou muito azulados	pH alterado	Fazer nova extensão. Ajustar o volume de tampão ou o pH
Extensão sem área de trabalho para avaliação da morfologia	Extensão muito grossa ou gota de sangue muito grande (preparo manual). Hemoglobina aumentada	Fazer novas lâminas exercendo mais pressão na extensora e aumentar a velocidade com que se empurra a gota de sangue na lâmina
Excesso de leucócitos grandes na periferia da extensão	Pressão demasiada sobre a extensora (preparo manual)	Fazer novas lâminas exercendo menos pressão na extensora

Fonte: Adaptada de Peterson e colaboradores.<sup>13</sup>

recoleta. Também se tem uma ideia em relação às contagens, se estão muito altas ou muito baixas e sobre a presença de células grandes como blastos, pró-mielócitos, fragmentos de megacariócitos e linfócitos atípicos, além de duplas populações de eritrócitos e parasitas grandes como a filaria.<sup>6,13,19</sup>

Pode-se estimar a contagem de leucócitos, plaquetas e reticulócitos, conforme **Quadro 3.5**. Essas técnicas são úteis como controle interno de qualidade das contagens, embora se observem erros inerentes a esse procedimento. Em qualquer estimativa microscópica, a média deve ser obtida por meio de contagem de, no mínimo, 10 campos

QUADRO 3.5   Procedimentos de estimativa microscópica da contagem de leucócitos, plaquetas e reticulócitos		
LEUCÓCITOS	PLAQUETAS	RETICULÓCITOS
Focalizar a área de trabalho adequada na extensão	Focalizar a área de trabalho adequada na extensão	Focalizar a área de trabalho adequada na extensão
Contar os leucócitos, incluindo os arrebitados, em pelo menos 10 campos de 100-400x	Contar plaquetas em pelo menos 10 campos de 1.000x em imersão	Contar policromatófilos em 5 campos com 200 eritrócitos em aumento de 1.000x em imersão
Dividir o número total de leucócitos contados pelo total de campos observados	Dividir o número total de plaquetas contadas pelo total de campos observados	Dividir o número total de policromatófilos contados por 5 e, em seguida, multiplicar por 2
Multiplicar a média por 250* quando utilizar aumento de 100x e por 2.000* utilizando aumento de 400x	Multiplicar a média por 13.800*	O fator de correção para corrigir o número de policromatófilos que pode ser subestimado devido ao pouco número de células contadas e à perda da tonalidade azul em reticulócitos mais maduros é 2

\* Fator de correção.  
Estimativas de leucócitos e plaquetas podem variar cerca de 15 a 20% ao redor de uma contagem automatizada normal. Em contagens muito baixas ou muito elevadas de leucócitos e plaquetas, a precisão em comparação com o contador automático pode variar. Variações maiores que o sugerido devem ser seguidas de repetições das contagens automatizadas.

Fonte: Adaptada de Maedel e Doig,<sup>6</sup> Comar, Danchura e Silva<sup>20</sup> e Escobar e colaboradores.<sup>21</sup>



microscópicos, independentemente do aumento que se esteja utilizando.

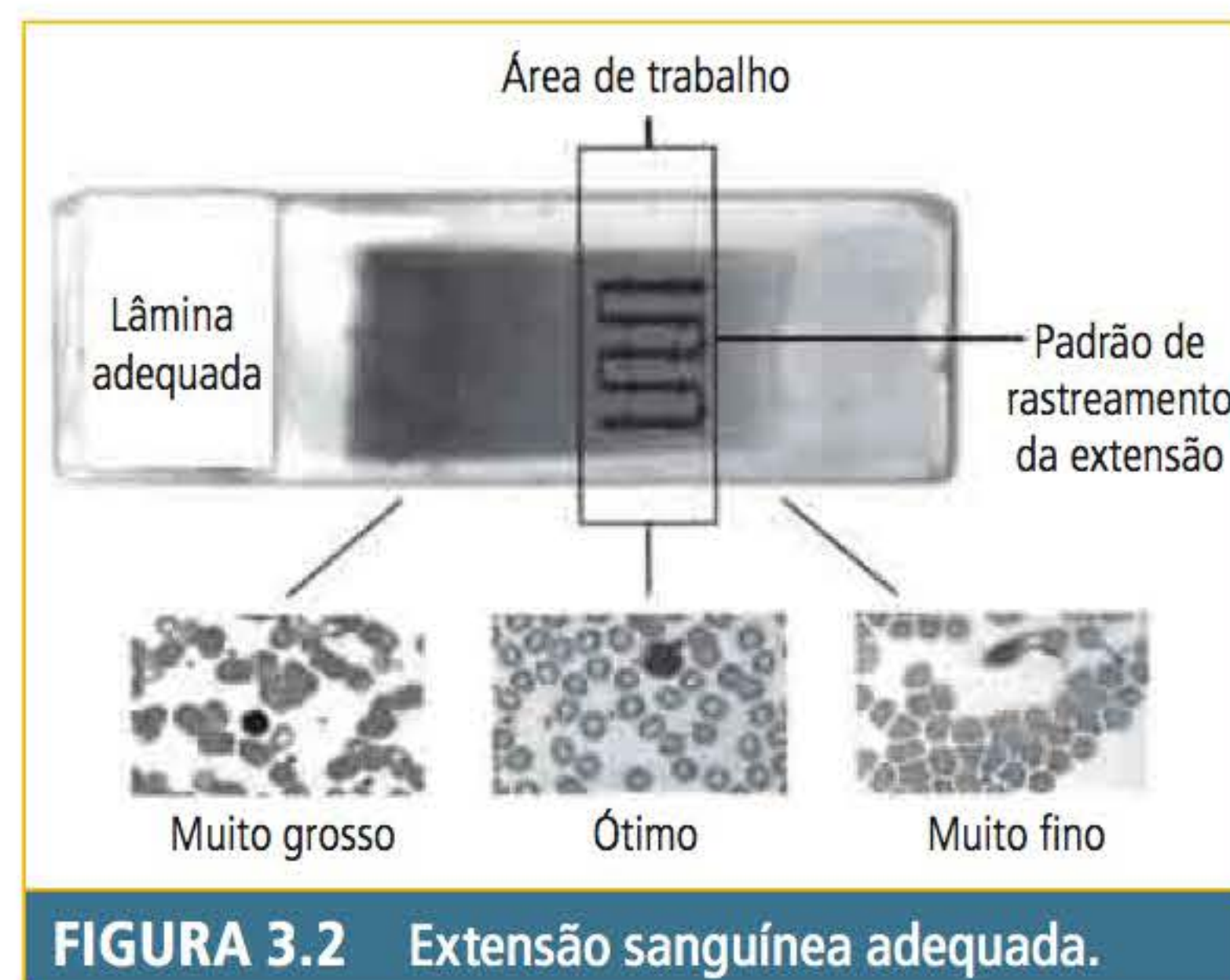
Deve-se avaliar leucócitos nas bordas da extensão, com objetiva de 10 e de 40x e, quando o valor da estimativa for superior a 3 vezes em relação ao observado no corpo da extensão, uma outra lâmina deve ser preparada e avaliada. No aumento de 400x se faz a seleção da área de trabalho, na qual se pode fazer a contagem diferencial de leucócitos e a avaliação da morfologia celular, caso seja um profissional experiente. Células grandes, como neutrófilos e monócitos, podem se concentrar nas bordas, resultando no acúmulo de células menores, como os linfócitos, no centro da extensão. Tal fato aumenta a imprecisão da contagem diferencial manual de leucócitos. Discrepâncias muito grandes entre a estimativa leucocitária e a contagem automatizada podem indicar problemas, tais como troca de amostra ou erros de identificação.<sup>6,13,19</sup>

No aumento de 1.000x com objetiva de imersão, também se pode fazer a contagem diferencial de leucócitos, sobretudo para iniciantes. É nesse aumento que deve ser realizada a confirmação dos detalhes morfológicos e nuances de células imaturas ou com morfologia duvidosa, assim como a quantificação das alterações dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Nesse aumento, os neutrófilos segmentados são mais facilmente diferenciados dos bastões, e as inclusões celulares são mais facilmente vistas, caso presentes. Pode-se estimar a contagem de plaquetas e de reticulócitos para se obter um valor aproximado da contagem automatizada (**Quadro 3.5**). Essa estimativa é útil em detectar discrepâncias com o resultado automatizado, mas deve ser feita na região da lâmina onde os eritrócitos tenham um mínimo de sobreposição.<sup>20</sup>

Pode-se, ainda, estimar o tamanho dos eritrócitos por meio de comparação com o núcleo dos linfócitos pequenos. Eritrócitos normais possuem diâmetro semelhante ao do núcleo de um linfócito pequeno. Quando a maioria dos eritrócitos que está no mesmo campo microscópico do linfócito é muito maior que o núcleo do linfócito, isso corresponde a uma macrocitose e, quando menor, à microcitose. Tal procedimento é uma boa ferramenta de controle interno de qualidade do volume corpuscular médio (VCM) fornecido pela automação.<sup>21,22</sup>

A análise microscópica deve ser realizada na melhor região da extensão, a qual se situa entre a região grossa da lâmina, onde a gota de sangue é

inicialmente colocada para confeccionar a extensão, e a região muito fina. Nessa região, denominada de área de trabalho, os eritrócitos estão uniformemente distribuídos, com poucos se tocando ou se sobrepondo e, nessa área, os eritrócitos possuem a forma clássica de disco bicôncavo, com o halo central pálido bem evidenciado. Quando a área de trabalho de uma extensão com contagem normal é vista, há geralmente cerca de 200 a 250 eritrócitos por campo de 1.000x. Em amostras com contagens globais dentro dos valores de referência, a área de trabalho deve conter uma área suficientemente grande para permitir uma avaliação morfológica adequada e possibilitar a contagem de 100 leucócitos com facilidade. Uma extensão adequada deve possuir uma transição gradual na espessura da área grossa para a área fina, terminando em uma borda em linha reta ou levemente arredondada,<sup>3</sup> conforme **Figura 3.2**.



**FIGURA 3.2** Extensão sanguínea adequada.

## CONSIDERAÇÕES

Antes de iniciar a revisão das lâminas, deve-se verificar se o relatório fornecido pelos analisadores hematológicos das contagens automatizadas confere com a identificação da extensão sanguínea. Para que sejam obtidos resultados mais precisos com as estimativas de leucócitos e plaquetas, sugere-se que os laboratórios padronizem os procedimentos de estimativa microscópica em relação aos diâmetros das oculares microscópicas utilizadas, à região ótima de leitura das lâminas e ao pessoal envolvido. Isso pode ser feito com um fator de correção em relação às técnicas originais descritas na literatura, o qual é obtido por meio da equação da reta ( $y = ax + b$ ), quando se faz análise de correlação em programas como o EXCEL (Microsoft Corporation®).<sup>20</sup>



A forma de escrutinação da lâmina, tanto vertical como horizontal, também deve ser padronizada quando dois ou mais profissionais fazem a leitura das lâminas. Em um estudo feito por um dos autores, observou-se que a escrutinação horizontal proporciona contagens diferenciais de leucócitos com maior correlação com a contagem diferencial automatizada.

GUIA DE PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMAS

Na literatura, existem vários sistemas de classificação para quantificar e relacionar o grau das alterações morfológicas das células sanguíneas. Alguns utilizam uma escala de 1 a 4 cruces e outros de 1 a 3 cruces, vinculadas à quantidade da alteração observada. A International Society for Laboratory Hematology (ISLH) sugere que mudanças  $\geq 2+$  (duas cruces) são clinicamente relevantes.<sup>24</sup> Outros autores utilizam pontos de corte para definir se uma alteração é clinicamente significativa. Por exemplo, quando mais de 5% dos eritrócitos apresentam determinada anormalidade morfológica, ela passa a ser relevante. Contudo, deve-se entender claramente que, em alguns casos, uma quantidade muito inferior pode ser crítica e clinicamente relevante, como presença de 1 a 2% (1+) de esquistócitos em pacientes com trombocitopenia, que pode significar um processo microangiopático, tal como PTT, e que o reconhecimento precoce dessas alterações pode salvar vidas.<sup>19</sup>

Alguns cuidados devem ser tomados pela equipe do laboratório de hematologia no sentido de padronizar os procedimentos de classificação das alterações morfológicas na leitura das lâminas. Tais cuidados conferem mais qualidade nas leituras, tornando possível a comparação de resultados sequenciais emitidos por diferentes profissionais do mesmo laboratório. Na sequência, serão apresentadas formas de realizar a padronização da leitura de lâminas e deseja-se que cada laboratório as utilize ou as adapte de acordo com as necessidades e preferências dos profissionais.

SÉRIE VERMELHA

Anisocitose, microcitose e macrocitose

A classificação microscópica da variação dos tamanhos dos eritrócitos é, em geral, realizada em termos semiquantitativos como leve, moderada ou acentuada, ou como de 1 a 3+. Quando realizada apropriadamente, de forma consistente e siste-

mática, contribui para se chegar ao correto diagnóstico, pelo menos em alguns casos. Uma anisocitose significativa pode ser observada em várias condições clínicas, incluindo situações com intensa produção de reticulócitos, anemia megaloblástica, transfusões e anemia ferropriva grave. A avaliação microscópica da anisocitose pode ser afetada pelas limitações visuais do olho humano, como descrito pela lei de Weber-Fechner, e pela possível ocorrência de diferentes concentrações de hemoglobina nos eritrócitos, as quais alteram o efeito de achatamento dessas células no vidro das lâminas.<sup>25,26</sup>

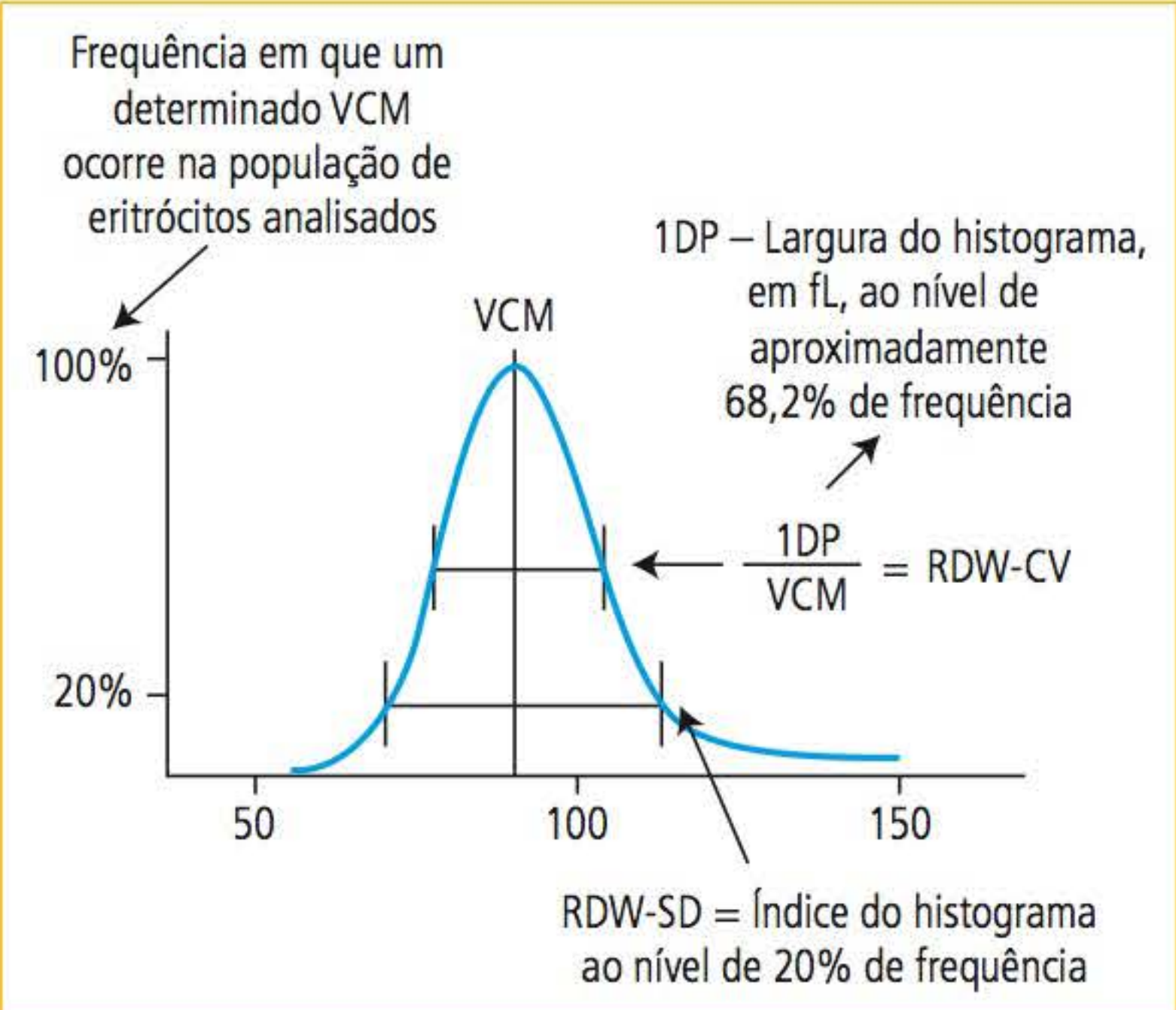
A variação do tamanho eritrocitário pode ser estimada quantitativamente com o uso do *red cell distribution width* (RDW) e pode ser graduada por meio de análise da série vermelha. O grau de variação da anisocitose pode ser determinado conforme **Tabela 3.4**.

TABELA 3.4 Grau de variação da anisocitose em função do RDW			
RDW-CV (%)	QUANTIFICAÇÃO	RDW-SD (fL)	QUANTIFICAÇÃO
15,5-19,0	+	47-62	+
19,1-24,0	++	62,1-75	++
> 24,0	+++	> 75	+++

Alguns trabalhos sugerem que o RDW-CV é mais sensível em indicar anisocitose em VCM microcíticos, e o RDW-SD é mais sensível em indicar anisocitose em VCM macrocíticos. Portanto, deve-se utilizá-los em conjunto a fim de aumentar a sensibilidade na detecção da anisocitose em lâmina.<sup>26</sup> O RDW-SD é fornecido apenas por alguns analisadores, como os das séries XT, XE E XN (Sysmex®), série LH (Beckman Coulter®) e os mais modernos da Mindray®. O RDW-CV e o RDW-SD são obtidos conforme **Figura 3.3**.

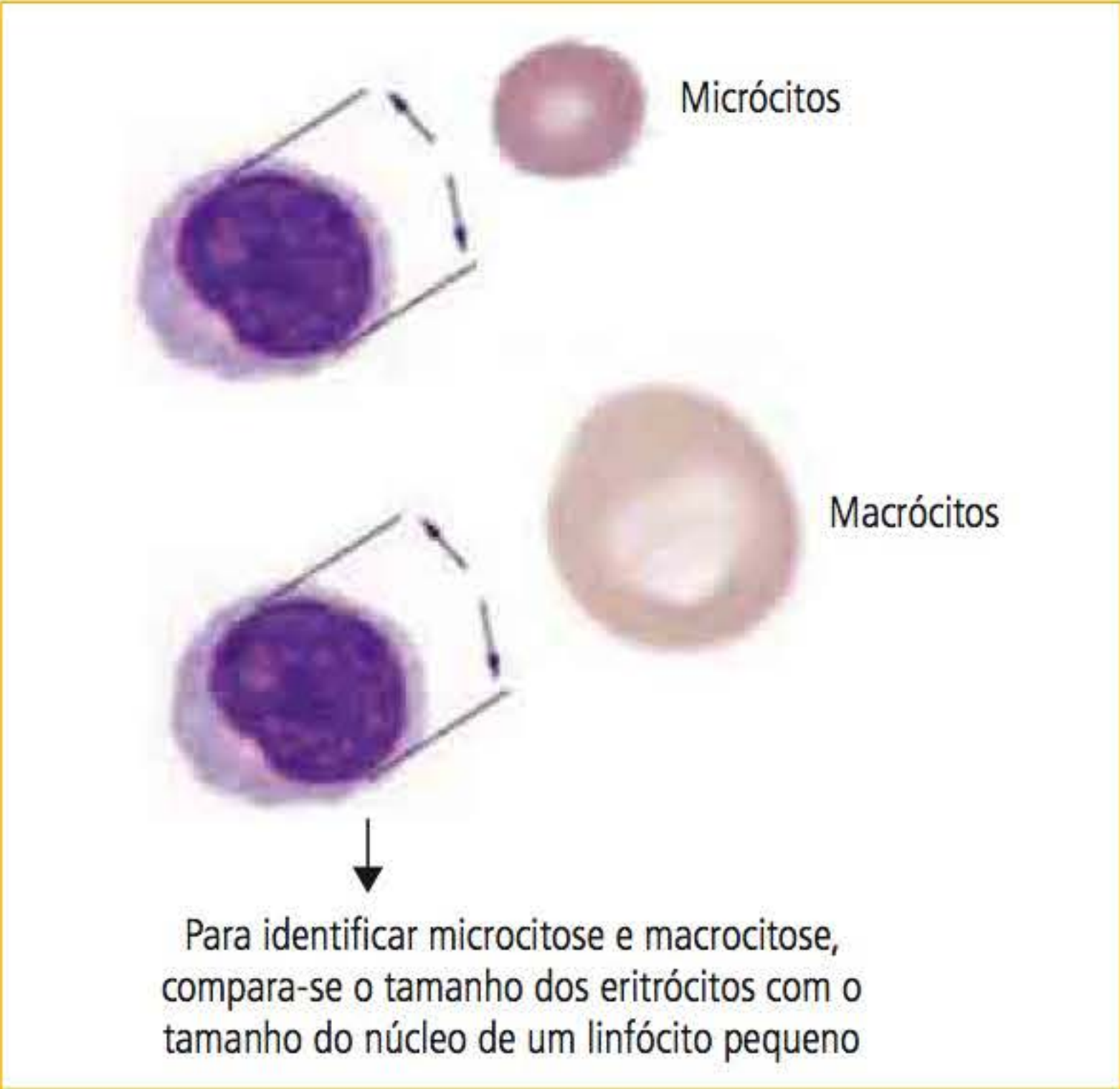
Para avaliar o tamanho eritrocitário e defini-lo como normocítico, microcítico ou macrocítico, primeiramente, deve-se localizar um linfócito maduro, normal e não atípico, para fins de comparação e análise da extensão. Eritrócitos normais possuem entre 6 e 8 micrômetros de diâmetro ou, aproximadamente, o mesmo tamanho que o núcleo de um linfócito pequeno. Portanto, os microcitos são menores que o núcleo de um linfócito pequeno, e os macrócitos são maiores (**Figura 3.4**), sendo estes mais evidentes quando possuem





**FIGURA 3.3** Obtenção do RDW-CV e RDW-SD a partir do histograma de distribuição dos volumes eritrocitários.

1DP, 1 desvio-padrão; VCM, volume corpuscular médio (fL).  
**Fonte:** Adaptada de Comar.<sup>27</sup>



**FIGURA 3.4** Microcitose e macrocitose.

volumes superiores a 110 fL. Esse tipo de observação é muito importante no sentido de se fazer um controle de qualidade do VCM medido pelo analisador hematológico e deve ser sempre realizada nos casos em que ocorrer um VCM muito baixo ou muito alto.

Deve ser revisado um mínimo de 10 campos microscópicos empregando-se objetiva de 100x em óleo de imersão. Contam-se os eritrócitos com diâmetro menor (micrócitos) e maior (macrócitos) que o do núcleo dos linfócitos pequenos em 10 campos microscópicos de 1.000x e com

distribuição uniforme dos eritrócitos. Em seguida, calcula-se a quantidade média de micrócitos e macrócitos por campo. Esses valores são somados, e a anisocitose é quantificada. A **Tabela 3.5** mostra como quantificar anisocitose, microcitose e macrocitose.

	QUANTIFICAÇÃO		
	1+	2+	3+
Microcitose	5-25% de micrócitos	25,1-50% de micrócitos	> 50% de micrócitos
Macrocitose	5-25% de macrócitos	25,1-50% de macrócitos	> 50% de macrócitos
Anisocitose	5-25% de micrócitos + macrócitos	25,1-50% de micrócitos + macrócitos	> 50% de micrócitos + macrócitos
200 eritrócitos por campo	10-50 células	51-100 células	> 100 células
150 eritrócitos por campo	8-37 células	39-75 células	> 75 células
100 eritrócitos por campo	5-25 células	26-50 células	> 50 células

1+, uma cruz (+); 2+, duas cruzes (++); 3+, três cruzes (+++).  
**Fonte:** Adaptada de Gulati,<sup>25</sup> e O'Connor.<sup>28</sup>

A microcitose e a macrocitose também podem ser graduadas empregando-se a **Tabela 3.6**. Esta tabela, de um modo geral, abrange a maioria dos casos e torna a tarefa mais fácil de ser realizada e padronizada pela equipe do laboratório. Porém, cada caso deve ser analisado isoladamente, pois podem ocorrer variações. Por exemplo, nos casos que ocorrer RDW elevado com VCM normal, deve-se caracterizar a presença de micrócitos e/ou macrócitos, a fim de justificar a variação de tamanho. Nesse caso, a anisocitose é, em geral, maior que a microcitose e a macrocitose isoladamente, pois corresponde ao somatório das duas.

A verificação do histograma de distribuição de RBC é muito importante, sobretudo nos casos com presença de dupla população, pois o gráfico pode mostrar a presença de dois picos de populações de eritrócitos.

O termo microcitose corresponde à quantidade e à intensidade de micrócitos na extensão sanguínea, ou seja, à quantidade de eritrócitos pequenos e à magnitude de sua pequenez. Ele é traduzido ma-



TABELA 3.6 Variação do tamanho eritrocitário em função do VCM							
IDADE	MICROCITOSE EM CRUZES			VCM (fL)	MACROCITOSE EM CRUZES		
	+++	++	+		+	++	+++
01 dia	< 60	60-69,9	70-90	101-128	130-140	140,1-145	> 145
02 dias	< 60	60-69,9	70-90	101-122	125-130	130,1-140	> 140
03 dias	< 60	60-69,9	70-90	95-121	125-130	130,1-140	> 140
04 dias	< 60	60-69,9	70-90	95-121	125-130	130,1-140	> 140
05 dias	< 60	60-69,9	70-90	95-123	125-130	130,1-140	> 140
06 dias	< 60	60-69,9	70-90	96-123	125-130	130,1-140	> 140
07 dias	< 60	60-69,9	70-90	96-129	132-140	140,1-145	> 145
1-2 semanas	< 60	60-69,9	70-85	90-131	132-140	140,1-145	> 145
2-3 semanas	< 60	60-69,9	70-85	90-119	120-130	130,1-140	> 140
1 mês	< 60	60-69,9	70-79,9	85-119	115-125	125,1-135	> 135
2-6 meses	< 60	60-69,9	70-73,9	74-108	110-120	120,1-130	> 130
7 meses a 2 anos	< 60	60-64,9	65-69,9	70-90	95-105	105,1-120	> 120
2-6 anos	< 60	60-69,9	70-74,9	75-90	95-105	105,1-120	> 120
6-12 anos	< 60	60-69,9	70-76,9	77-95	99-105	105,1-120	> 120
♂ 12-18 anos (mas.)	< 60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	> 125
♀ 12-18 anos (fem.)	< 60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	> 125
♂ 18 ou mais (mas.)	< 60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-129,9	> 130
♀ 18 ou mais (fem.)	< 60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-129,9	> 130
Gestante 1º trim.	< 60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	> 125
Gestante 2º trim.	< 60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	> 125
Gestante 3º trim.	< 60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	> 125

tematicamente pelo VCM, que expressa sua média. Já o termo macrocitose, inversamente, corresponde à quantidade e à intensidade de macrócitos na extensão sanguínea, ou seja, à quantidade de eritrócitos grandes e à intensidade de seus grandes tamanhos. Sendo assim, é traduzido matematicamente pelo VCM, que expressa sua média.

Poiquilocitose

Eritrócitos normais são redondos e possuem uma área de palidez central que ocupa um terço da célula. Poiquilocitose é o termo usado para descrever a variação na forma dos eritrócitos e está geralmente associada com anemias graves com regeneração eritrocitária ativa ou hematopoiese extramedular. Muitos poiquilócitos possuem seus nomes baseados em suas características morfológicas individuais; outros não possuem nomes em virtude da falta de

características específicas e, por isso, são chamados apenas de poiquilócitos. A forma dos eritrócitos deve analisada em um mínimo de 10 campos contendo entre 100 e 200 células, usando a objetiva de 100x; no entanto, cada forma eritrocitária anormal deve ser avaliada individualmente. A média por campo microscópico de cada alteração de forma eritrocitária em particular deve ser determinada, e o grau de cada alteração de forma particular é definido conforme **Tabela 3.7**.

A intensidade da poiquilocitose deve ser liberada pela soma de cada alteração de forma eritrocitária encontrada por campo de 1.000x, conforme **Tabela 3.8**.

Por exemplo, codócitos (média de 3/campo = 1+), esferócitos (média de 3/campo = 1+) e eliptócitos (média de 10/campo = 2+) resultam em uma poi-



TABELA 3.7 Quantificação das formas eritrocitárias

FORMA ERITROCITÁRIA	QUANTIFICAÇÃO: MÉDIA DE ALTERAÇÕES/ 10 CAMPOS DE 1.000x			
	RAROS	1+	2+	3+
Acantócitos	1	2-6	7-12	> 12
Codócitos	1	2-6	7-12	> 12
Dacriócitos	1	2-6	7-12	> 12
Drepanócitos	1	2-6	7-12	> 12
Eliptócitos/Ovalócitos	1	2-6	7-12	> 12
Equinócitos	1	2-6	7-12	> 12
Esferócitos	1	2-6	7-12	> 12
Fragmentos eritrocitários	1	2-6	7-12	> 12
Estomatócitos	1	2-6	7-12	> 12
Queratócitos	1	2-6	7-12	> 12
Cristais de hemoglobina C e SC	1	2-6	7-12	> 12

TABELA 3.8 Quantificação da poiquilocitose

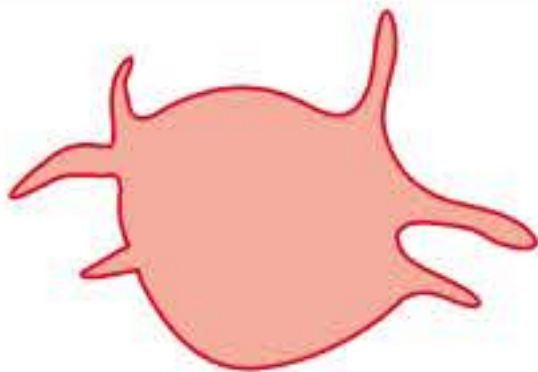
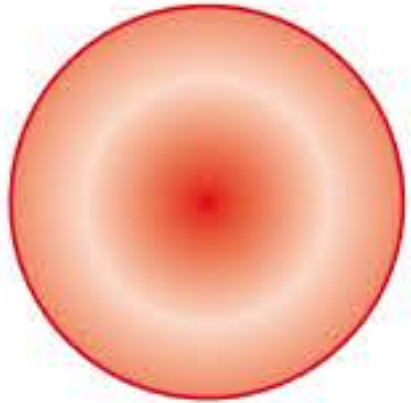
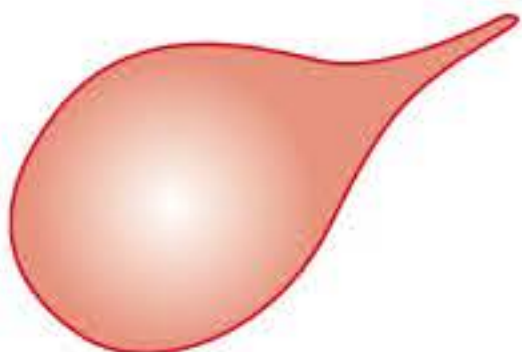
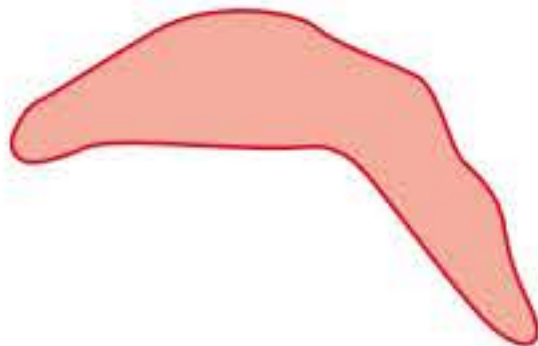
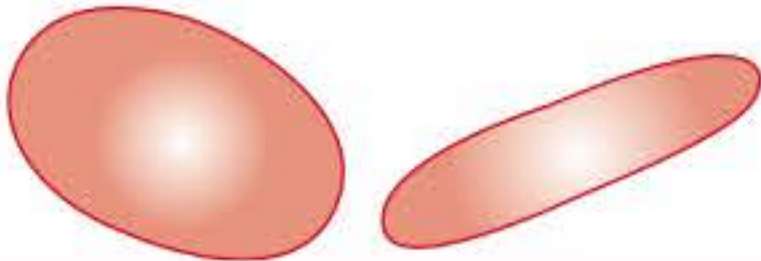
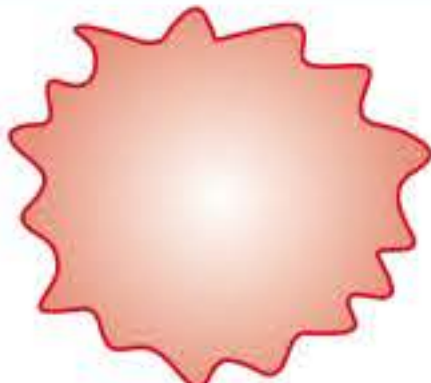
POIQUILÓCITOS / CAMPO DE 1.000x (100-200 CÉLULAS)	QUANTIFICAÇÃO DA POIQUILOCILOSE
1	Discreta
2-6	+
7-12	++
> 12	+++

quilocitose de somas das médias = 16/campo = 3+. A Tabela 3.9 mostra os principais tipos de formas eritrocitárias e as condições clínicas associadas.

Policromatofilia

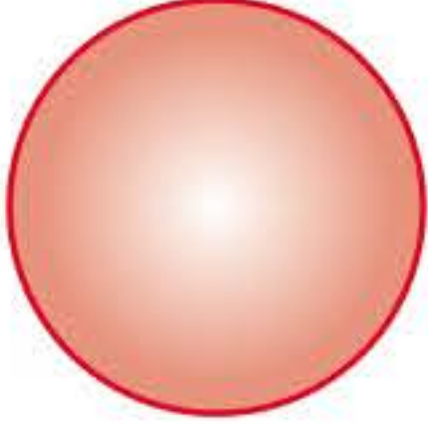
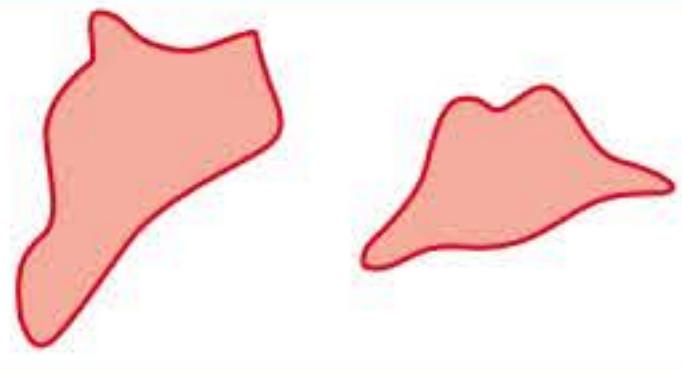
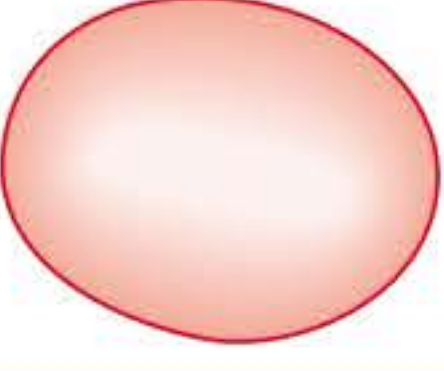
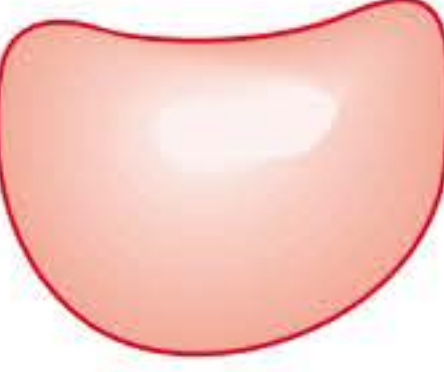
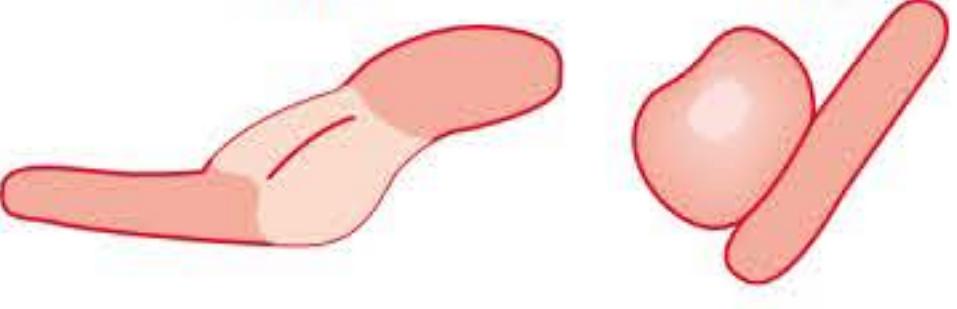
Os eritrócitos policromáticos do hemograma correspondem aos reticulócitos corados pelo azul de cresil brilhante. Quanto mais imaturos forem os

TABELA 3.9 Principais formas eritrocitárias observadas rotineiramente e condições clínicas associadas

FORMA ANORMAL		CONDIÇÃO CLÍNICA ASSOCIADA
Acantócitos		Acantocitose hereditária, doença hepática, hipoesplenismo, pós-esplenectomia, queimaduras graves, abetalipoproteinemia, anemias hemolíticas, doença renal e deficiências enzimáticas
Codócitos		Codócitos microcíticos: talassemias, deficiência de ferro, presença de hemoglobina C e E. Codócitos normocíticos: anemia falciforme, hemoglobinopatia SC, doença hepática, hipoesplenismo e pós-esplenectomia. Codócitos macrocíticos: doença hepática e pós-esplenectomia. Codócitos artefatuais: excesso de umidade na extensão e excesso de EDTA
Dacriócitos		Mielofibrose, mielodisplasias, anemias hemolíticas adquiridas, anemia megaloblástica, talassemias, hiperesplenismo, infiltração medular de tumores hematológicos e não hematológicos
Drepanócitos		Anemia falciforme e associações com talassemias e hemoglobinopatias
Eliptócitos/ovalócitos		Eliptocitose hereditária, anemia megaloblástica, anemia de doença crônica, deficiência de ferro, mielodisplasias, trauma mecânico. Pode ocorrer artefactualmente
Equinócitos		Doença renal e hepática. Artefato de preparo da extensão (pH alcalino do vidro), excesso de EDTA e amostras envelhecidas (> 12 horas). Como sua presença ocorre muito devido ao artefato, a sua interpretação deve ser baseada no contexto clínico do paciente

(continua)



TABELA 3.9 Principais formas eritrocitárias observadas rotineiramente e condições clínicas associadas (continuação)		
FORMA ANORMAL		CONDIÇÃO CLÍNICA ASSOCIADA
Esferócitos		Esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune e microangiopática, incompatibilidade ABO, hiperesplenismo, queimaduras graves, hemoglobinopatias, transfusão com eritrócitos velhos, malária, doença hepática. Pode ser artefato da região mais fina da extensão
Esquistócitos ou esquizócitos ou fragmentos eritrocitários		Púrpura trombocitopênica trombótica, síndrome hemolítico-urêmica, coagulação intravascular disseminada, queimaduras graves, traumas mecânicos, talassemia maior, anemia megaloblástica, síndrome HELLP, vasculite, pós-quimioterapia e anemias hemolíticas
Estomatócitos		Estomatocitose hereditária, alcoolismo, infecções graves. Artefato por exposição dos eritrócitos a pH ácido, substâncias catiônicas e medicamentos (fenotiazina e clorpromazina)
Queratócitos		Estresse oxidativo <i>in vivo</i> por uso certos medicamentos, deficiência de G6PD e presença de hemoglobinas instáveis (corpos de Heinz)
Cristais de hemoglobina C e SC		Hemoglobinopatias C e SC

HELLP, acrônimo do inglês: H, *hemolytic anemia*; EL, *elevated liver enzymes*; LP, *low platelet count*.  
**Fonte:** Adaptada de Silva e colaboradores,<sup>4</sup> Pierre,<sup>10</sup> Gulati,<sup>25</sup> e O'Connor.<sup>28</sup>

reticulócitos, mais intensa e de fácil distinção será sua tonalidade azul-acinzentada na lâmina (**Figura 3.5**).



Os reticulócitos quase maduros, com poucos grânulos de RNA, possuem aspecto policromático de difícil identificação e, às vezes, não são visíveis ao olho humano. Por isso, a contagem de reticulócitos é

mais exata que a policromatofilia em lâmina. Aproximadamente 1% dos eritrócitos do sangue de uma pessoa normal é policromatófilo. A policromatofilia está associada com anemias hemolíticas, regeneração medular e resposta ao tratamento de anemias carenciais. A policromatofilia pode ser quantificada nas lâminas conforme **Tabela 3.10**.

TABELA 3.10 Quantificação da policromatofilia		
POLICROMATÓFILOS / CAMPO DE 1.000x (100-200 CÉLULAS)	QUANTIFICAÇÃO	RETICULÓCITOS (%)
1	Discreta	± 2,5-3,0
2-6	+	± 3,0-6,0
7-12	++	± 6-11,0
> 12	+++	± > 11,0



Hipocromia

A hipocromia é definida morfolologicamente quando os eritrócitos possuem halo central maior que 1/3 do seu volume (Figura 3.6). É traduzida físico-quimicamente pela concentração (relação soluto/solvente em g/dL) de hemoglobina intraeritrocitária, ou seja, pela CHCM e não simplesmente pelo seu conteúdo (valor absoluto do peso do soluto em picogramas) de hemoglobina, a HCM. A HCM reflete a concentração de hemoglobina de cada eritrócito; por isso, podemos dizer que um eritrócito de tamanho pequeno tem menos hemoglobina que um eritrócito grande, o que não quer dizer que ele seja hipocrômico por essa razão, pois a quantidade de hemoglobina em seu interior é proporcional ao seu tamanho.

A hipocromia pode ser quantificada conforme Tabelas 3.11 e 3.12. Um mínimo de 10 cam-

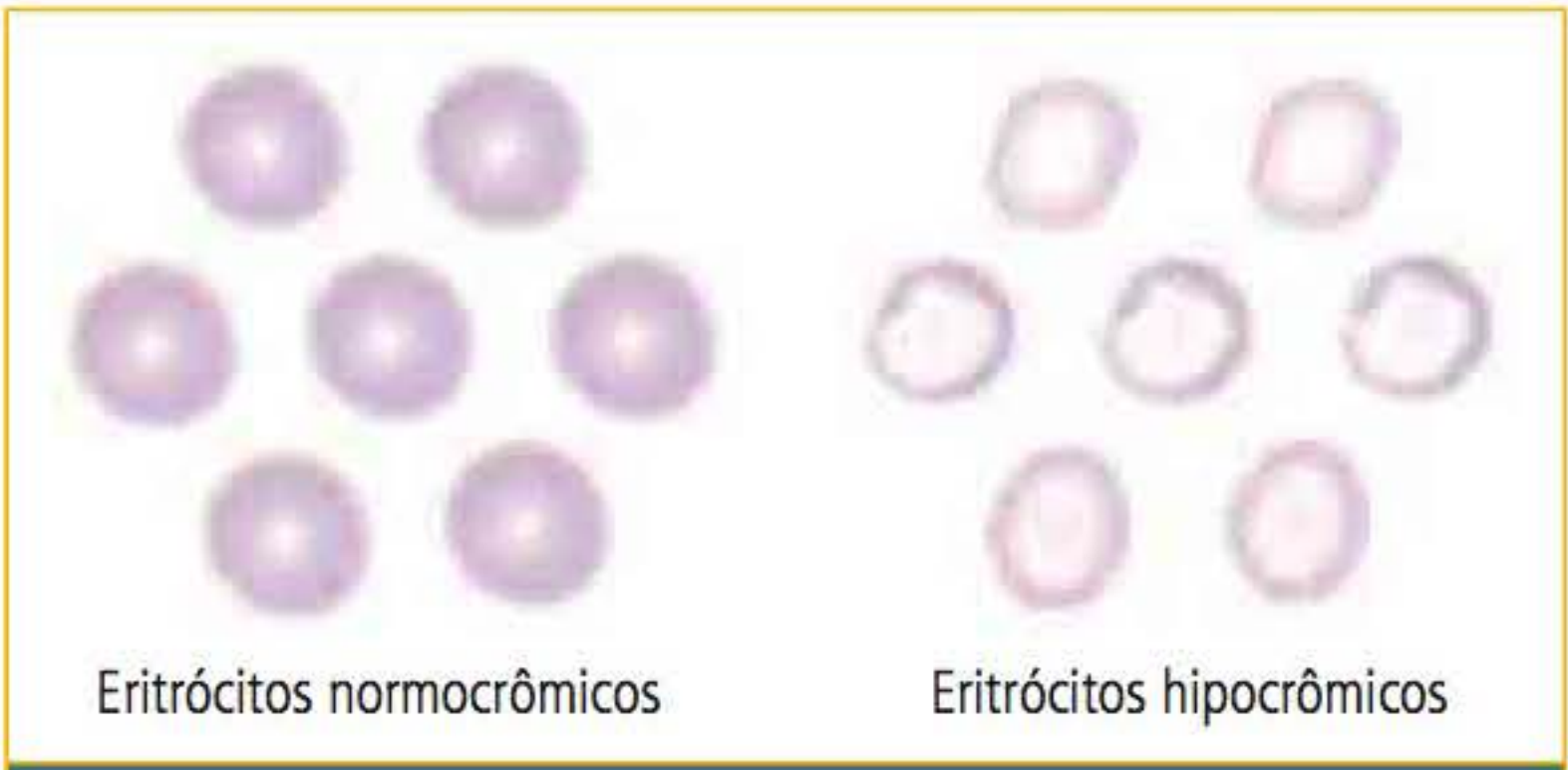


FIGURA 3.6 Eritrócitos normocrômicos e hipocrômicos.

pos microscópicos, empregando-se objetiva de 100x em óleo de imersão, deve ser revisado, e os eritrócitos com coloração pálida e com halo central mais largo devem ser enumerados. Calcula-se o número médio de cada classificação por campo microscópico e reporta-se da seguinte maneira:

TABELA 3.11 Grau de variação da hipocromia			
QUANTIFICAÇÃO DA HIPOCROMIA	1+	2+	3+
CONDIÇÃO	5-25% DE ERITRÓCITOS HIPOCRÔMICOS	25,1-50% DE ERITRÓCITOS HIPOCRÔMICOS	> 50% DE ERITRÓCITOS HIPOCRÔMICOS
200 eritrócitos por campo	10-50 células	51-100 células	> 100 células
150 eritrócitos por campo	8-37 células	39-75 células	> 75 células
100 eritrócitos por campo	5-25 células	26-50 células	> 50 células

TABELA 3.12 Grau de variação da hipocromia em função do CHCM				
IDADE	HIPOCROMIA EM CRUZES			CHCM (g/dL)
	+++	++	+	
01 dia	< 28	28-29	29-29,9	30-36
02 dias	< 28	28-29	29-29,9	30-36
03 dias	< 28	28-29	29-29,9	30-36
04 dias	< 28	28-29	29-29,9	30-36
05 dias	< 28	28-29	29-29,9	30-36
06 dias	< 28	28-29	29-29,9	30-36
07 dias	< 28	28-29	29-29,9	30-36
1-2 semanas	< 28	28-29	29-29,9	30-36
2-3 semanas	< 28	28-29	29-29,9	30-36
1 mês	< 27	27,1-27,9	28-28,9	29-36
2-6 meses	< 28	28-29	29-29,9	30-36
7 meses a 2 anos	< 28	28,1-29,4	29,5-30,9	31-36
2-6 anos	< 28	28,1-29,4	29,5-30,9	31-36
6-12 anos	< 28	28,1-29,4	29,5-30,9	31-36

(continua)



TABELA 3.12 Grau de variação da hipocromia em função do CHCM (continuação)				
IDADE	HIPOCROMIA EM CRUZES			CHCM (g/dL)
	+++	++	+	
♂ 12-18 anos (mas.)	< 28	28,1-29,9	30-31,5	32-36
♀ 12-18 anos (fem.)	< 28	28,1-29,9	30-31,5	32,5-36
♂ 18 ou mais (mas.)	< 28	28,1-29,9	30-31,5	32,5-36
♀ 18 ou mais (fem.)	< 28	28,1-29,9	30-31,5	32,2-36
Gestante 1º trim.	< 28	28,1-29,9	30-31,5	32-36
Gestante 2º trim.	< 28	28,1-29,9	30-31,5	32-36
Gestante 3º trim.	< 28	28,1-29,9	30-31,5	32-36

Inclusões eritrocitárias

As inclusões eritrocitárias, como ponteados basófilos, corpúsculos de Howell-Jolly, anéis de Cabot, corpúsculos de Pappenheimer (Figura 3.7), podem ser quantificadas conforme Tabela 3.13.



FIGURA 3.7 Inclusões eritrocitárias.

TABELA 3.13 Quantificação das inclusões eritrocitárias	
PONTEADOS BASÓFILOS CORPÚSCULO DE HOWELL-JOLY ANEL DE CABOT CORPÚSCULOS DE PAPPENHEIMER VALOR MÉDIO POR CAMPO DE 1.000x EM IMERSÃO	
1 a cada 2 campos ou 1 / campo	Raros
1-3 por campo	+
4-6	++
> 6	+++

Os ponteados basófilos são formados por agregados ribossomais, na forma de partículas finas ou grossas, que preenchem quase todo o eritrócito. Eles estão associados a talassemias, hemoglobinopatias, envenenamento por chumbo, deficiência de pirimidina 5' nucleotidase e síndromes mielodisplásicas. Contudo, alguns autores têm relatado que os ponteados basófilos finos são

apenas artefatos de coloração e que apenas os ponteados grossos têm importância clínica.

Os corpúsculos de Howell-Jolly são formados por fragmentos nucleares (restos de DNA) e aparecem como pequenos corpúsculos arredondados, de tamanho variável e de cor púrpura dentro dos eritrócitos. Eles estão associados a hipoesplenismo, pós-esplenectomia, anemia falciforme, talassemia maior, anemia hemolítica grave, anemia megaloblástica e diseritropoiese congênita.

Os anéis de Cabot foram primeiramente descritos em 1903, pelo médico americano Richard Clarke Cabot, como finos cordões na forma de laços ou anéis no interior dos eritrócitos e acredita-se que sejam microtúbulos remanescentes do fuso mitótico. Eles estão associados a anemia megaloblástica, anemia hemolítica, envenenamento por chumbo, leucemias, icterícia alcoólica e também têm sido observados em pacientes que fazem uso de citostáticos.

Os corpúsculos de Pappenheimer são grânulos anormais de ferro dentro dos eritrócitos e são formados por fagossomos que englobam quantidades excessivas de ferro. Aparecem como densos grânulos localizados na periferia dos eritrócitos e estão associados a anemia sideroblástica e anemias hemolíticas de um modo geral. São visíveis nas colorações derivadas de Romanowsky, mas a confirmação da existência de ferro nos grânulos é feita com a coloração de Pearls, que utiliza azul da prússia.

Rouleaux eritrocitário e aglutinação eritrocitária

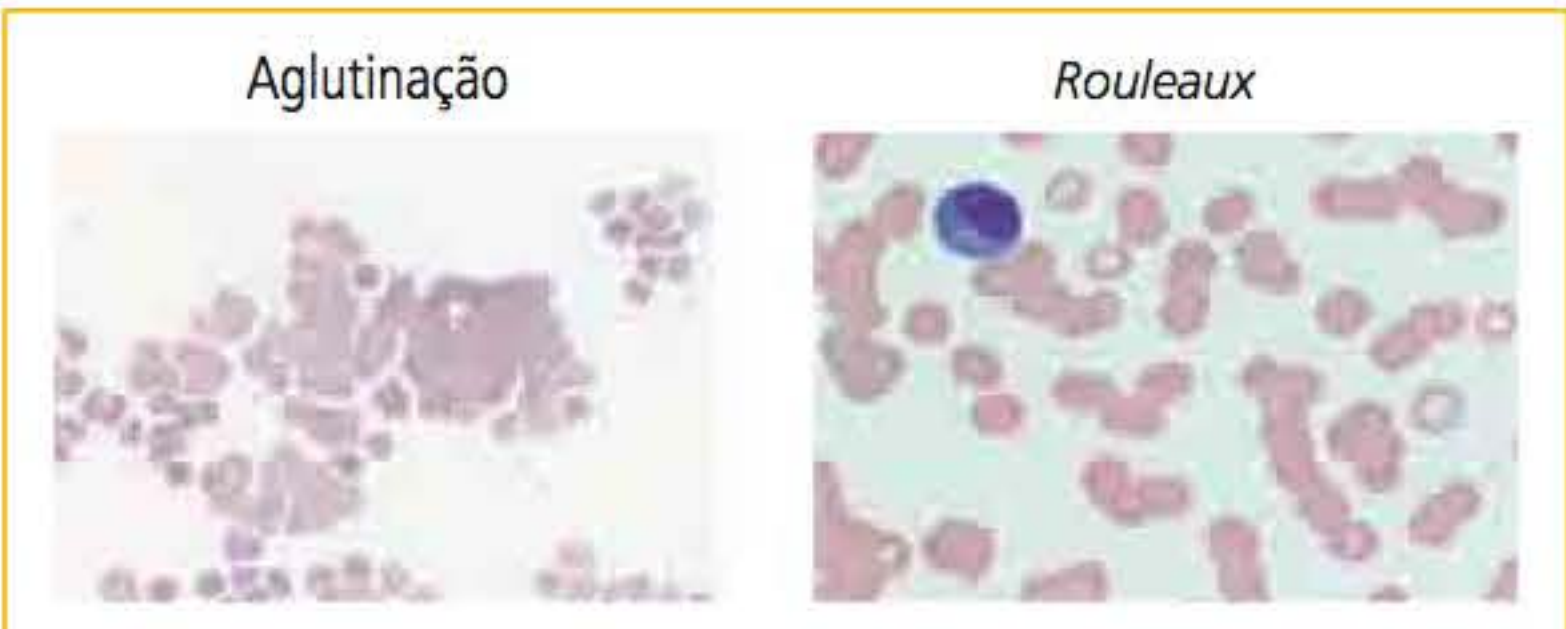
O rouleaux eritrocitário e a aglutinação eritrocitária podem ser quantificados conforme Tabela 3.14. O rouleaux é definido como o empilhamento



de eritrócitos na forma de pilhas de moedas na parte fina da extensão. Ocorre como resultado da perda da carga negativa da superfície dos eritrócitos, os quais são revestidos com excesso de proteínas plasmáticas. Está associado com mieloma múltiplo e estados inflamatórios e infecciosos, já que ambos podem estar associados com hiperproteinemia (globulinas e fibrinogênio).

TABELA 3.14 Quantificação de <i>rouleaux</i> e aglutinação dos eritrócitos	
% MÉDIA DE ERITRÓCITOS FORMANDO ROULEAUX OU AGLUTINAÇÃO POR CAMPO DE 1.000x	QUANTIFICAÇÃO
10-25%	+
25-50%	++
Acima de 50%	+++

A aglutinação eritrocitária é formada por agregados de eritrócitos resultantes da presença de um autoanticorpo frio, os quais podem atuar em quaisquer temperaturas abaixo de 37 °C. O anticorpo é uma IgM, e os agregados de eritrócitos geralmente se sobrepõem. As amostras contendo aglutinação eritrocitária precisam ser incubadas a 37 °C durante 30 minutos previamente à reanálise, de modo a se obter resultados mais confiáveis das contagens. Deve ser feita uma diferenciação entre aglutinação e *rouleaux* conforme **Figura 3.8**.

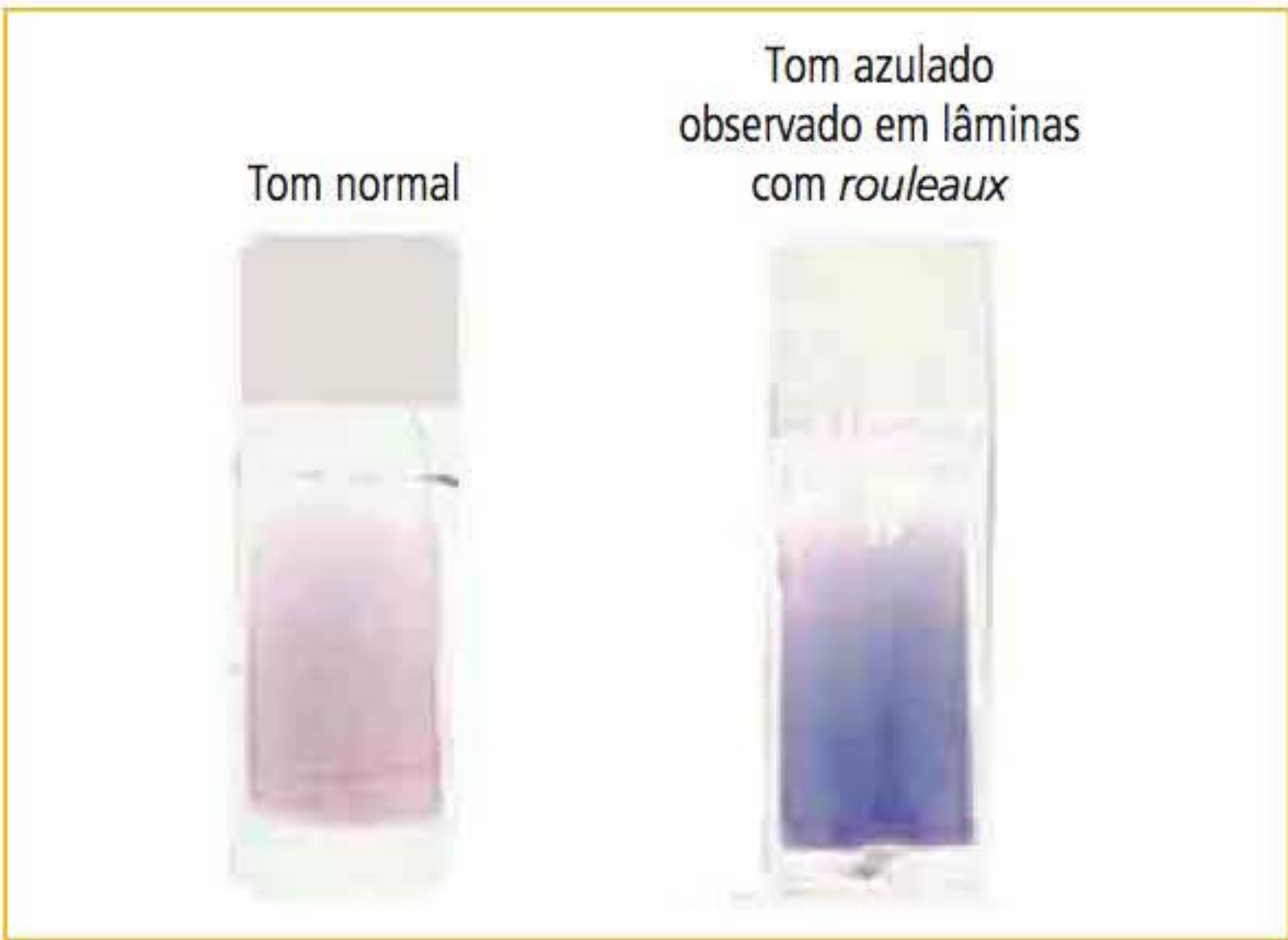


**FIGURA 3.8** Diferença entre aglutinação e *rouleaux* eritrocitário.

Em um campo microscópico, com aumento de 1.000x, pode-se visualizar vários grupamentos de eritrócitos empilhados ou aglutinados. Para quantificar, deve-se observar a proporção de eritrócitos empilhados ou aglutinados por campo microscópico. Observar a cor da extensão pode ajudar, pois, na maioria dos casos positivos para *rouleaux* eritrocitário, ela possui tom azulado (**Figura 3.9**).

Nos casos de aglutinação, pode-se observar pequenos grumos nas paredes do tubo de EDTA. Nos

casos em que houver dúvidas quanto à presença de *rouleaux* eritrocitário na lâmina, pode-se fazer uma VHS do paciente e, caso o resultado seja alterado, confirma-se a formação de *rouleaux* na extensão.



**FIGURA 3.9** Diferença de tonalidade observada nos casos positivos para *rouleaux* eritrocitário.

SÉRIE BRANCA

GRANULAÇÕES TÓXICAS, VACÚOLOS CITOPLASMÁTICOS E CORPÚSCULOS DE DÖHLE

A granulação tóxica representa a visualização das granulações primárias em metamielócitos e neutrófilos. Em situações fisiológicas, essas células não possuem as granulações reveladas. As granulações tóxicas aparecem em decorrência da abreviação da mitose no processo de proliferação dos neutrófilos, como observado nas septicemias. A septicemia é a designação para o conjunto de manifestações patológicas devido à invasão, por via sanguínea, do organismo por germes patogênicos provenientes de um foco infeccioso.

Os vacúolos citoplasmáticos nos neutrófilos são observados em estados infecciosos e evidenciam fagocitose de bactérias na corrente sanguínea, ou seja, uma bacteremia, que é a passagem da bactéria pela circulação, ou uma septicemia.

Os corpúsculos de Döhle, que podem acompanhar as granulações tóxicas, são representados pelo retículo endoplasmático rugoso que fica alterado devido à grande proliferação celular. O aparecimento de granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle podem ser correlacionados com infecções bacterianas graves. A quantificação de granulações tóxicas, vacuolização citoplasmática em neutrófilos e corpúsculos de Döhle pode ser



realizada com o auxílio da **Tabela 3.15** e pode ser visualizada na **Figura 3.10**.

Para mais detalhes sobre a interpretação clínica dessas 3 inclusões citoplasmáticas dos leucócitos, ver Capítulo 8, Série branca: leucograma.

TABELA 3.15    Inclusões em neutrófilos	
GRANULAÇÕES TÓXICAS VACUOLIZAÇÃO CITOPASMÁTICA CORPÚSCULOS DE DÖHLE (OBSERVAR PELO MENOS 50 NEUTRÓFILOS EM CAMPO DE 1.000x)	
Até 30% de neutrófilos com granulações tóxicas	+
30-60%	++
> 60%	+++



**FIGURA 3.10**    Corpúsculos de Döhle, granulações tóxicas e vacúolos citoplasmáticos.

ANOMALIAS HEREDITÁRIAS DOS LEUCÓCITOS

A avaliação de inclusões leucocitárias é muito importante para saber o tipo de alteração que o paciente apresenta. No caso da anomalia de Alder-Reilly, liberar na observação do hemograma a presença de granulação azurófila grosseira nos neutrófilos, sugestiva de anomalia de Alder-Reilly.

No caso da anomalia de Pelger-Huët, liberar na observação do hemograma a presença de neutrófilos hipossegmentados sugestivos de anomalia de Pelger-Huët.

No caso da anomalia de May-Hegglin, liberar na observação do hemograma a presença de neutrófilos com inclusões citoplasmáticas sugestivas de anomalia de May-Hegglin.

No caso da anomalia de Chédiak-Higashi, liberar na observação do hemograma a presença de granulócitos, monócitos, linfócitos e eosinófilos com grânulos grosseiros, sugestivos de anomalia de Chédiak-Higashi.

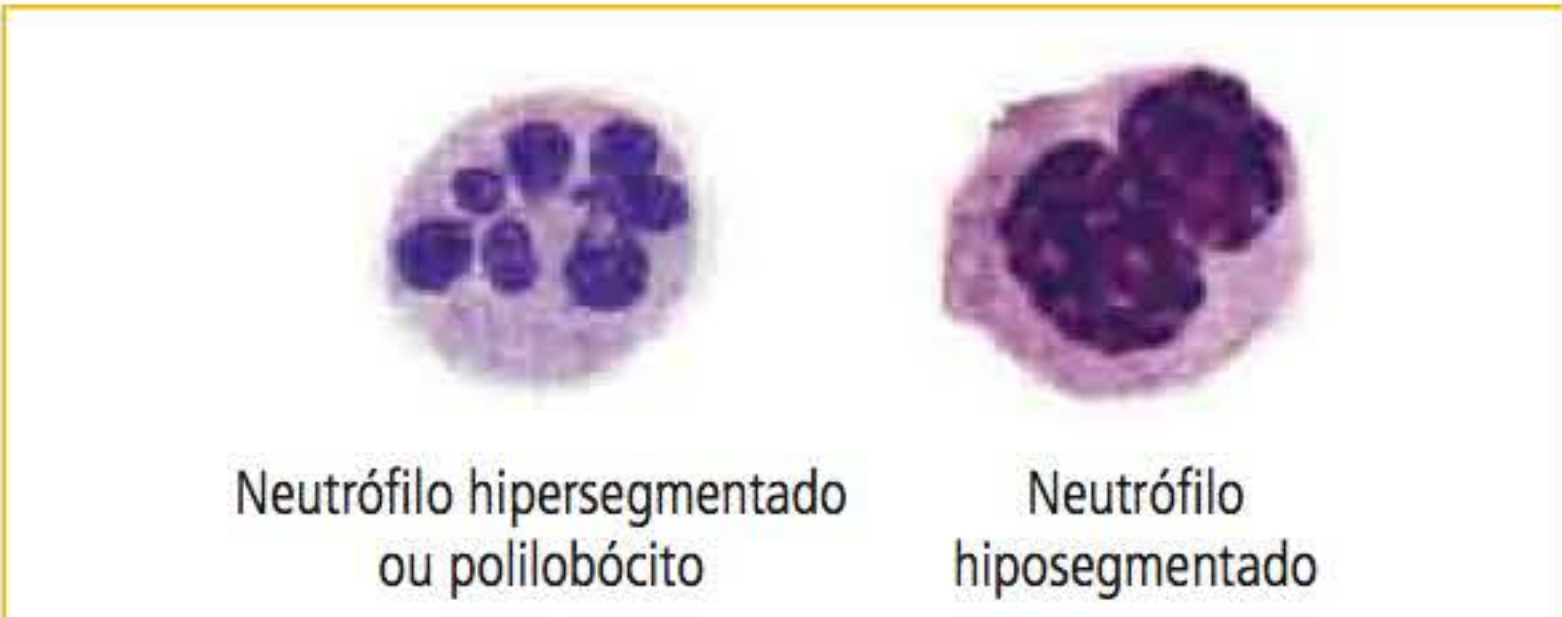
**POLILOBÓCITOS E HIPOSEGMENTAÇÃO**  
O neutrófilo hipersegmentado é, por definição, uma célula que apresenta 6 lóbulos ou mais e a sua

quantidade passa a ser significativa quando se tem no sangue periférico  $\geq 5/100$  neutrófilos contados. O resultado é relatado em porcentagem, mas tal contagem somente deverá ser realizada quando, na avaliação da lâmina, forem constatadas  $\geq 2+$ . Neste caso, deve-se liberar em cruces e em porcentagem na observação do hemograma. Os polilobócitos podem aparecer na anemia megaloblástica, no uso de corticoides, mielodisplasias, quimioterapia e, muito raramente, na anemia ferropriva e uremia.

A hipossegmentação indica a diminuição da segmentação ou a não segmentação do núcleo de granulócitos maduros. Pode ser vista primariamente em neutrófilos, mas pode também ser vista em eosinófilos e basófilos em determinadas situações. Neutrófilos bilobulados ou unilobulados são considerados hipossegmentados e estão associados à síndrome de Pelger-Huët ou pseudo Pelger-Huët. Esta última está associada com quimioterapia, doenças mieloproliferativas e mielodisplasias.

Os polilobócitos e os hipossegmentados podem ser quantificados com o auxílio da **Tabela 3.16** e visualizados na **Figura 3.11**.

TABELA 3.16    Quantificação de polilobócitos e hipossegmentados	
(OBSERVAR PELO MENOS 50 NEUTRÓFILOS EM CAMPO DE 1.000x)	
Até 30% de polilobócitos ou hipossegmentados	+
30-50%	++
> 50%	+++



**FIGURA 3.11**    Neutrófilos hipersegmentado e hipossegmentado.

**GRANULÓCITOS HIPOGRANULARES OU AGRANULARES**  
Granulócitos hipogranulares ou agranulares são, na maioria das vezes, granulócitos displásicos que perderam os grânulos citoplasmáticos. Essa alteração é muito evidente em segmentados e bastões, mas também pode ser observada em metamielócitos,



mielócitos e pró-mielócitos e está associada com mielodisplasias. Os granulócitos hipogranulares ou agranulares podem ser quantificados com o auxílio da **Tabela 3.17** e visualizados na **Figura 3.12**.

TABELA 3.17 Quantificação de granulócitos hipogranulares ou agranulares	
(OBSERVAR PELO MENOS 50 NEUTRÓFILOS EM CAMPO DE 1.000x)	
Até 30% de granulócitos hipogranulares ou agranulares	+
30-50%	++
> 50%	+++

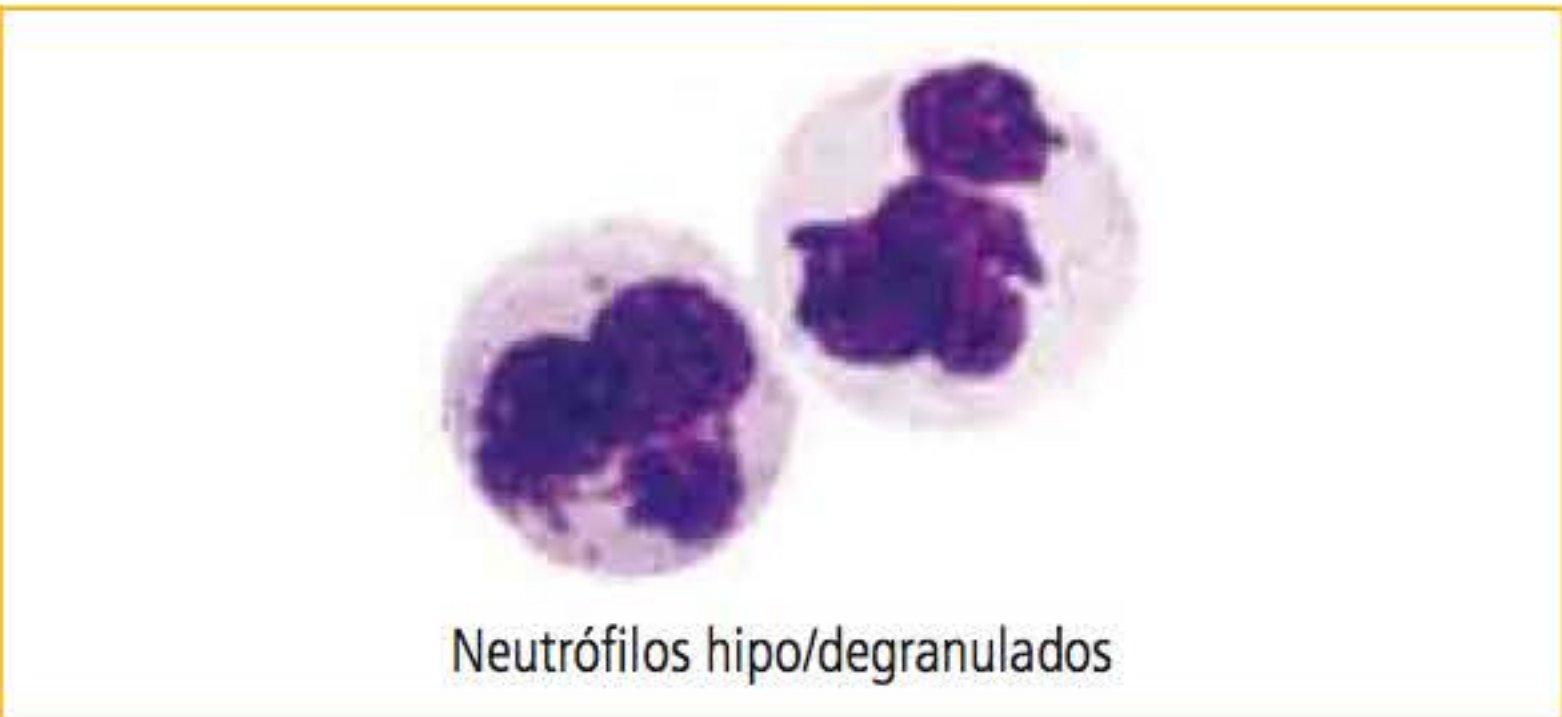


FIGURA 3.12 Hipo/degranulação de neutrófilos.

Fonte: Adaptada de Gulati.<sup>25</sup>

FRAGMENTOS DE CITOPLASMA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS/PLAQUETAS HIPOGRANULARES OU AGRANULARES

Representam pedaços do citoplasma de células nucleadas, especialmente de células leucêmicas. É difícil distinguir fragmentos citoplasmáticos de células leucêmicas de plaquetas hipogranulares/ agranulares. A cor do citoplasma e a natureza dos grânulos podem, às vezes, ser úteis na distinção. Geralmente, ambos são agrupados se os fatores de distinção não são convincentes. A contagem de plaquetas pode ser prejudicada, dependendo do tamanho e da quantidade desses fragmentos. Podem ser quantificados com o auxílio da **Tabela 3.18**, e, na **Figura 3.13**, podem ser vistos fragmentos de citoplasma de células leucêmicas.

RESTOS NUCLEARES

Restos nucleares ou *smudge cells* são restos distorcidos de núcleos de células, especialmente as de origem linfóide. É um fenômeno que ocorre *in vitro* durante a confecção da extensão sanguínea, fazendo com que as células se rompam e os núcleos se distorçam de maneira amórfica e estão associados com neoplasias hematológicas, especialmente a

TABELA 3.18 Quantificação de fragmentos de citoplasma de células leucêmicas/plaquetas hipogranulares ou agranulares

(VALOR MÉDIO POR CAMPO DE 1.000x EM IMERSÃO)	
2-3	+
4-5	++
> 5	+++

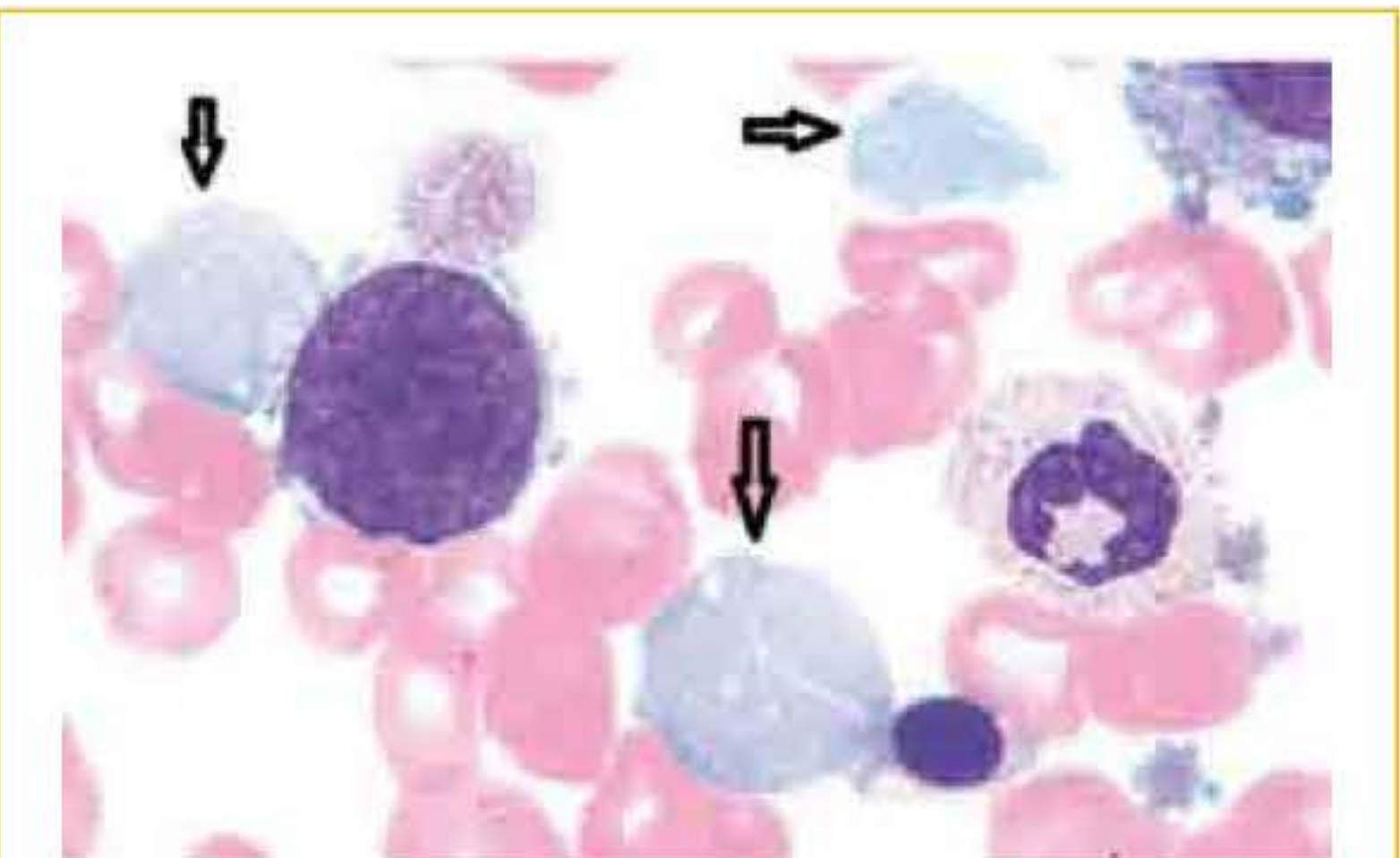


FIGURA 3.13 Fragmentos de citoplasma de células leucêmicas.

Fonte: Adaptada de Gulati.<sup>25</sup>

leucemia linfocítica crônica. Os restos nucleares podem ser quantificados de acordo com a **Tabela 3.19** e visualizados na **Figura 3.14**.

TABELA 3.19 Quantificação de restos nucleares

(VALOR MÉDIO POR CAMPO DE 1.000x EM IMERSÃO)	
2-3	+
4-5	++
> 5	+++

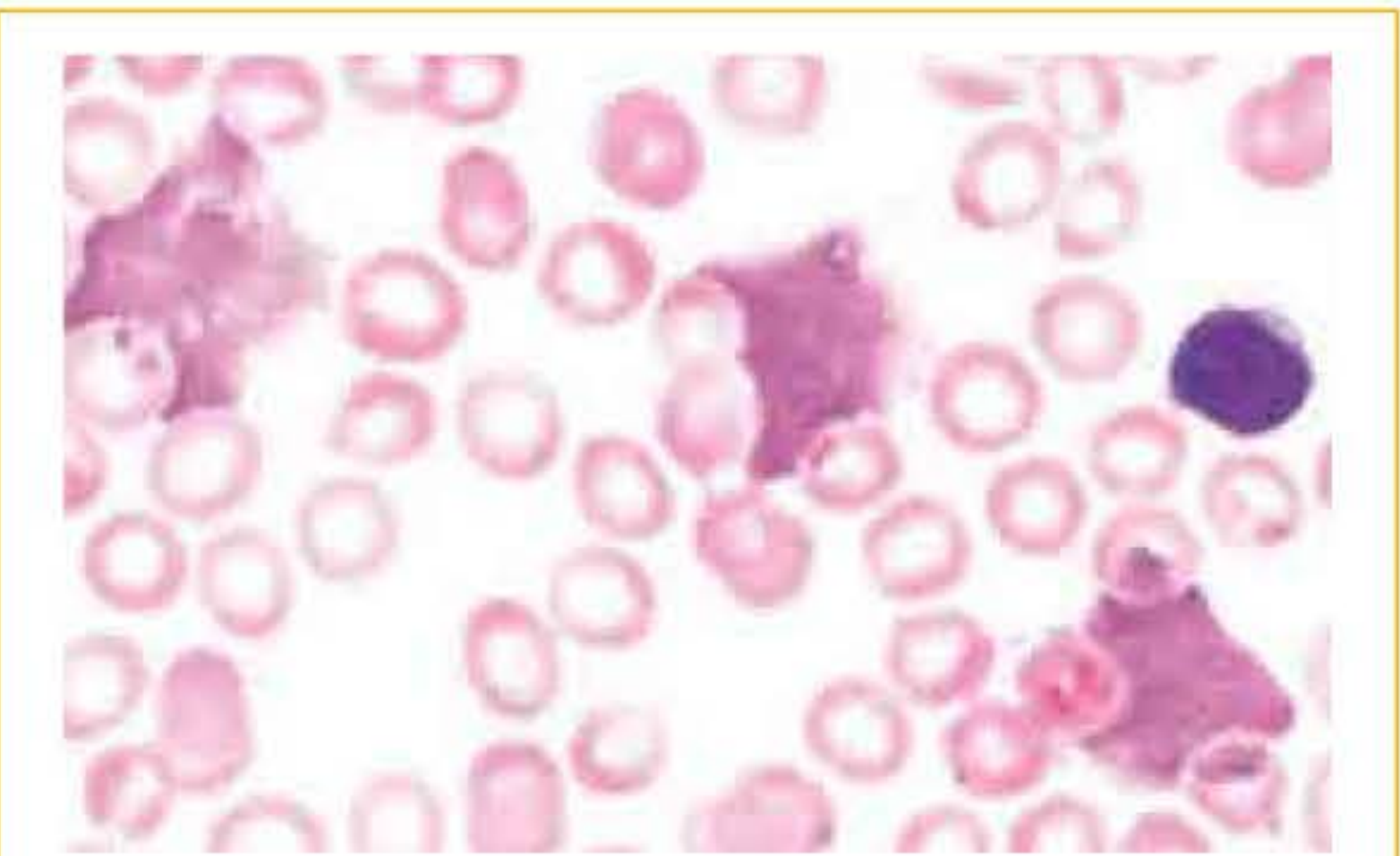


FIGURA 3.14 Restos nucleares.

Fonte: Adaptada de Gulati.<sup>25</sup>



PLAQUETAS

PLAQUETAS GIGANTES

Plaquetas gigantes são observadas na síndrome de Bernard-Soulier, púrpura trombocitopênica idio-pática (PTI), anomalia de May-Hegglin e em doenças mieloproliferativas. Nessas situações, o volume plaquetário médio (VPM) é geralmente maior que 20 fL, ou seja, as plaquetas são pratica-mente do tamanho dos eritrócitos. Uma quantida-de elevada de plaquetas gigantes pode indicar uma possível mielofibrose.

Os analisadores hematológicos, que medem plaquetas pelo princípio da impedância, às vezes não conseguem contá-las nem medir o seu volume em virtude do volume plaquetário ultrapassar o limiar de diferenciação entre plaquetas e eritróci-tos microcíticos. Para corrigir esses problemas, deve-se solicitar contagem de plaquetas por méto-do alternativo ao da impedância. É conveniente liberar presença de plaquetas gigantes no hemo-grama somente nos casos citados acima. Podem ser quantificadas conforme Tabela 3.20 e visuali-zadas na Figura 3.15.

TABELA 3.20 Quantificação de plaquetas gigantes	
(COMO % MÉDIA POR CAMPO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE PLAQUETAS POR CAMPO DE 1.000x)	
5-25%	+
25-50%	++
> 50%	+++

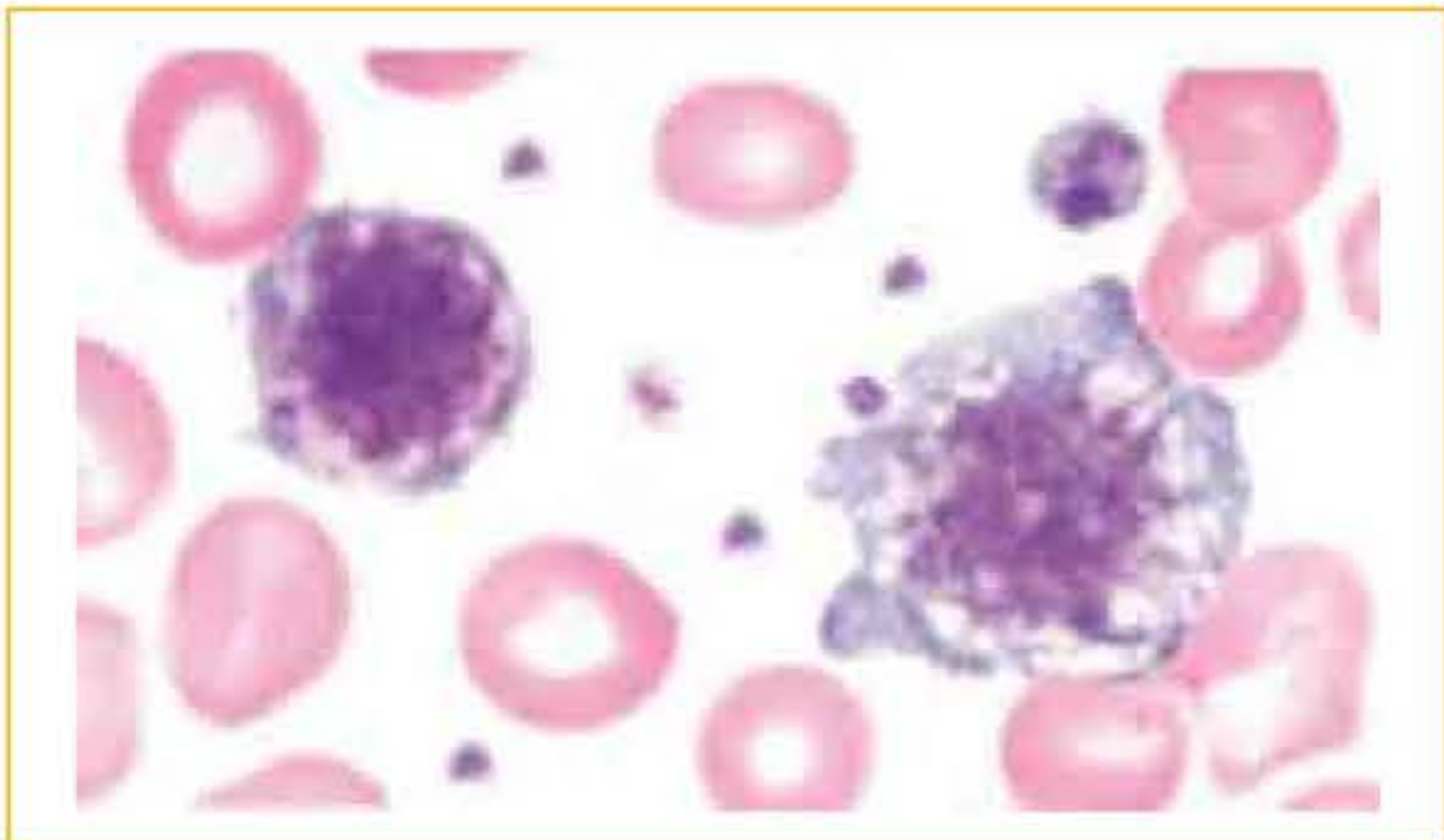


FIGURA 3.15 Plaquetas gigantes.

Fonte: Adaptada de Gulati.<sup>25</sup>

MACROPLAQUETAS E MICROPLAQUETAS

As macroplaquetas são plaquetas de tamanho au-mentado que não chegam a ser do tamanho de pla-quetas gigantes. A presença de macroplaquetas está

correlacionada com patologias como infarto do miocárdio, septicemia, gravidez, diabetes melito, hipertireoidismo, tuberculose, leucemia mieloide crônica, talassemia heterozigota, entre outras.

As microplaquetas são mais raras, porém po-dem aparecer e, nesses casos, a citação de sua pre-sença no hemograma é muito importante. Pode-se observar microplaquetas na síndrome de Wiskott-Aldrich, quimioterapia citotóxica, supressão da medula óssea devido à septicemia, pacientes HIV positivos, hipotireoidismo, insuficiência renal crô-nica, entre outras. A quantificação do tamanho plaquetário pode ser realizada com o auxílio con-junto das Tabelas 3.21 e 3.22, enquanto a Figura 3.16 mostra macroplaquetas em sangue periférico.

TABELA 3.21    Quantificação do tamanho plaquetário				
SYSMEX® SÉRIES XT/XE (IMPEDÂNCIA)				
Quantificação	Valor de referência (fL) 9,4-12,6	Quantificação das macroplaquetas		
Valores < 5,0 liberar presença de microplaquetas		+	++	+++
		12,7-13,9	14,0-15,0	> 15,0
BAYER ADVIA® 120/2120 (ÓPTICO)				
Quantificação	Valor de referência (fL) 6,5-11,0	Quantificação das macroplaquetas		
Valores < 5,0 liberar presença de microplaquetas		+	++	+++
		11,5-12,9	13,0-14,5	> 14,5

TABELA 3.22 Quantificação de macroplaquetas e microplaquetas	
(COMO % MÉDIA POR CAMPO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE PLAQUETAS POR CAMPO DE 1.000x)	
5-25%	+
25-50%	++
> 50%	+++

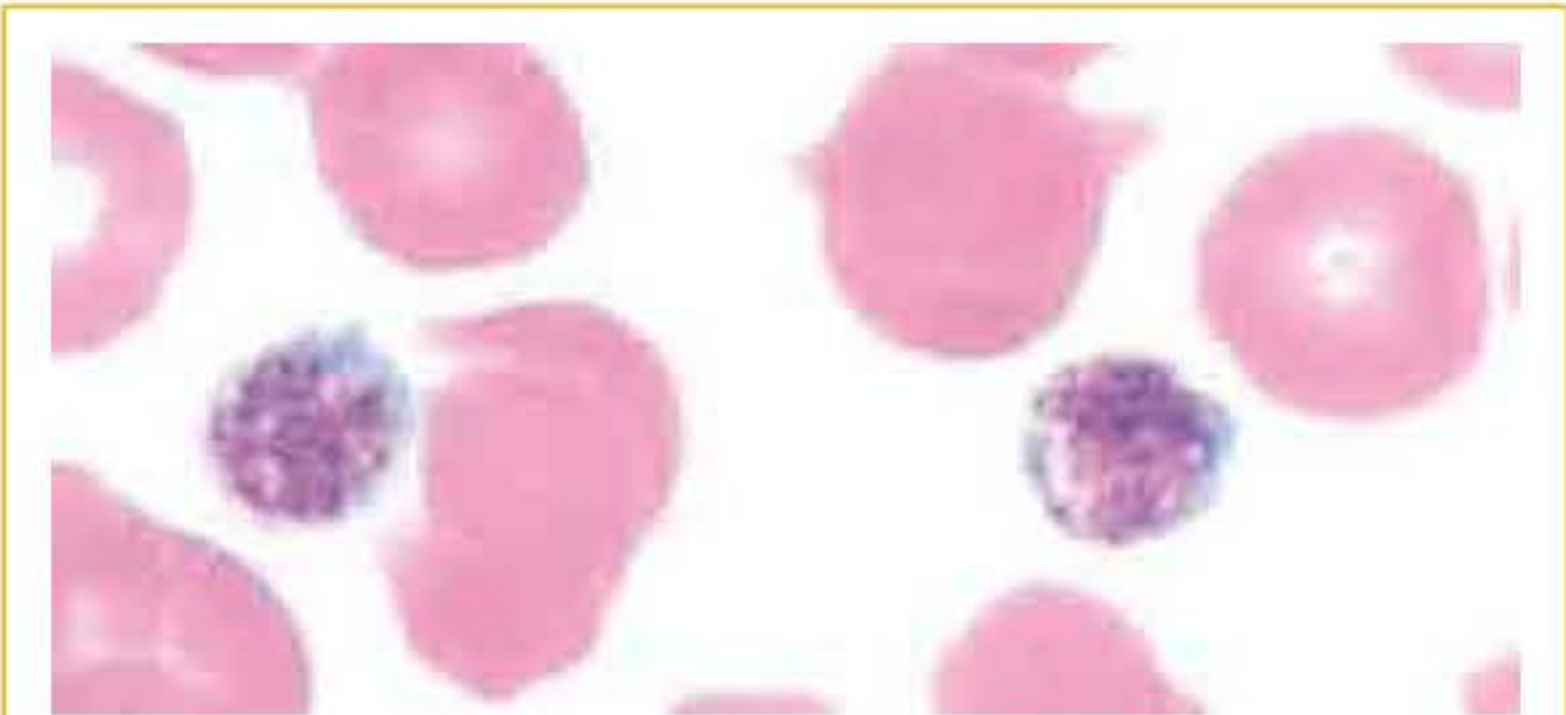


FIGURA 3.16 Macroplaquetas.

Fonte: Adaptada de Gulati.<sup>25</sup>



ANISOCITOSE PLAQUETÁRIA

O PDW (do inglês *platelet distribution width*) é um índice que expressa a diferença de tamanho entre as plaquetas, ou seja, anisocitose plaquetária, e pode estar aumentado em estados pré-trombóticos, doenças coronarianas, leucemias mieloides agudas e crônicas, anemia megaloblástica, entre outras. A presença de anisocitose plaquetária é sugerida com o apoio da Tabela 3.23.

TABELA 3.23 Anisocitose plaquetária	
SYSMEX® SÉRIES XT/XE (IMPEDÂNCIA)	QUANTIFICAÇÃO
PDW VR = 9,8-16,2 fL	> 18,0 fL: citar na observação, caso a presença de anisocitose plaquetária seja confirmada na lâmina
BAYER ADVIA® 120/2120 (ÓPTICO)	QUANTIFICAÇÃO
PDW VR = 25-65%	> 80,0%: citar na observação, caso a presença de anisocitose plaquetária seja confirmada na lâmina

SATELITISMO PLAQUETÁRIO E AGREGADOS PLAQUETÁRIOS

As plaquetas podem se agregar ao redor de neutrófilos e monócitos em uma formação denominada de “roseta”. Tal formação é referenciada como satelitismo plaquetário. Em geral, é observada em extensões confeccionadas com sangue em EDTA. Os agregados plaquetários podem se formar em decorrência de uma punção difícil em que houve coagulação parcial da amostra e em

amostras coletadas em EDTA. Satelitismo plaquetário e agregados plaquetários podem conduzir a resultados falsamente diminuídos da contagem automatizada de plaquetas e sua identificação e quantificação podem dar uma noção da extensão da interferência nas contagens de plaquetas. Podem ser quantificados conforme Tabela 3.24 e visualizados na Figura 3.17.

TABELA 3.24 Quantificação de satelitismo plaquetário e agregados plaquetários	
(VALOR MÉDIO POR CAMPO DE 1.000x EM IMERSÃO)	
2-3	+
4-5	++
> 5	+++

UNIFORMIZAÇÃO DE CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS TIPOS DE LEUCÓCITOS

Existem algumas situações que provocam controvérsias na contagem diferencial de leucócitos, como a diferenciação entre neutrófilos e bastonetes, linfócitos e monócitos, linfócitos e linfócitos atípicos. Considerando que profissionais formados em épocas diferentes e por universidades diversas possam trabalhar juntos nos laboratórios de hematologia e considerando, ainda, que esses profissionais aprenderam a morfologia das células do sangue com algumas pequenas variações regionais e de acordo com o professor que as

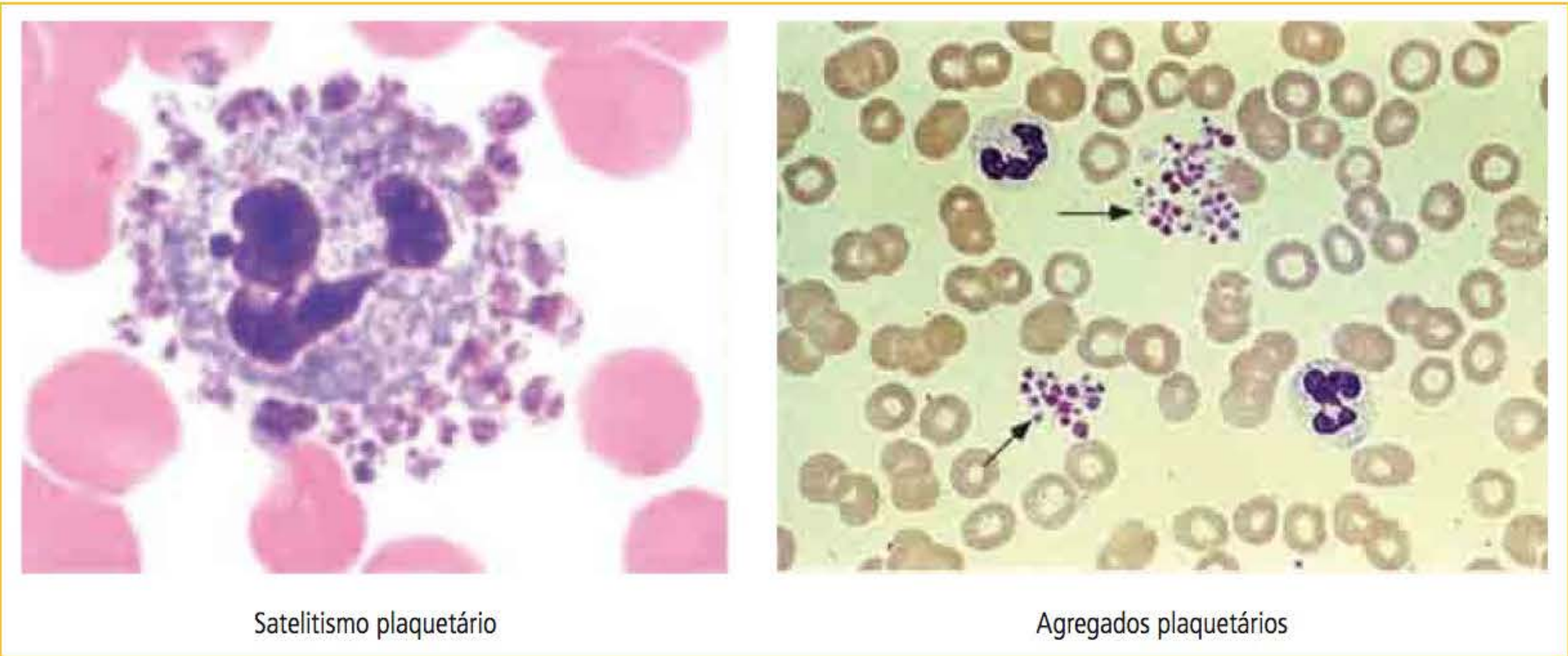


FIGURA 3.17 Satelitismo plaquetário e agregados plaquetários.

Fonte: Adaptada de Gulati.<sup>25</sup>



ensinou, torna-se importante uniformizar os critérios morfológicos para a classificação dos principais tipos de células do sangue em cada laboratório de hematologia. Essa uniformização de critérios otimiza a reprodutibilidade e comparabilidade entre diferentes microscopistas. Os critérios morfológicos para cada tipo celular devem estar detalhadamente descritos em procedimentos operacionais padrão e devem ser seguidos à risca por todos os profissionais do mesmo laboratório de hematologia.

O bastonete é, sem dúvida, a célula que mais controvérsias provoca na contagem diferencial. Muitas vezes, critérios pessoais de diferenciação são utilizados, mas esses não encontram respaldo na literatura internacional. No Capítulo 8 (Série branca: leucograma), estão descritos critérios morfológicos para a diferenciação entre neutrófilos e bastonetes. Percebe-se que existem inúmeros critérios descritos por vários autores importantes. Nenhum deles está errado; contudo, quando se trabalha em um mesmo laboratório, todos devem falar a mesma língua, ou seja, utilizar o mesmo critério morfológico de diferenciação.

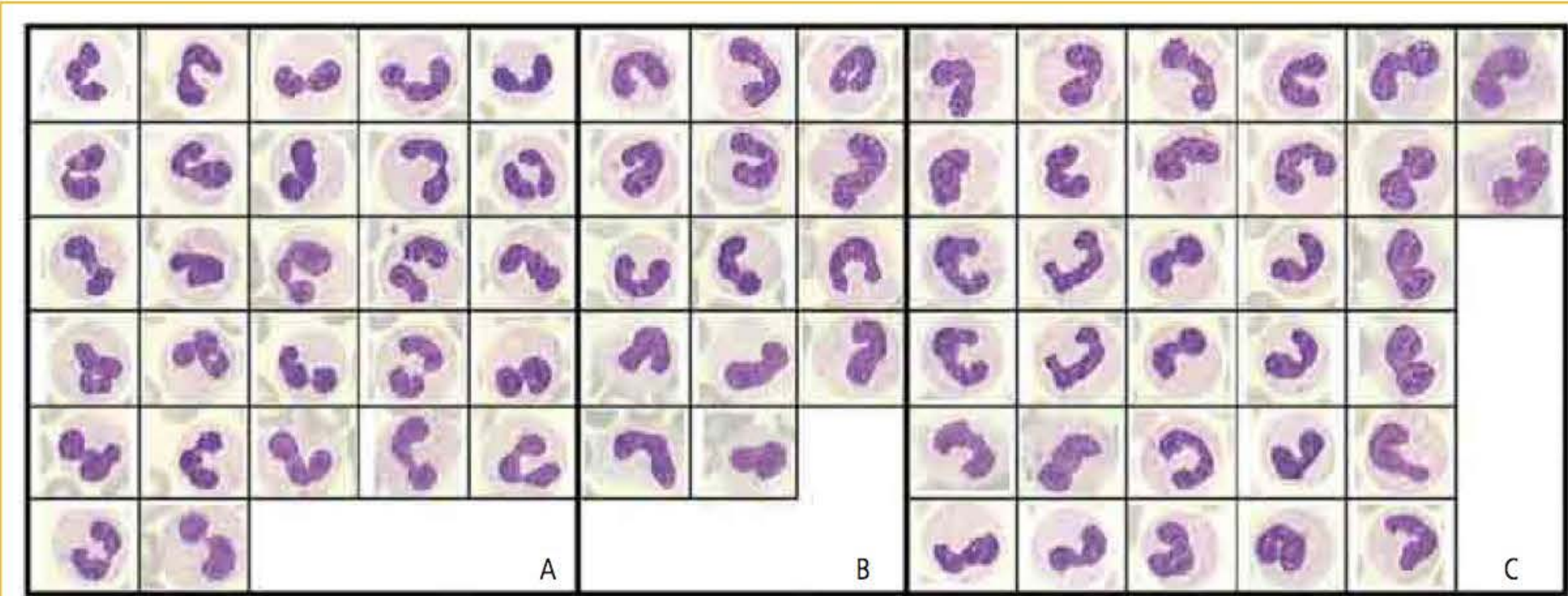
Como exemplo de critério morfológico para bastonetes, segue abaixo uma descrição que foi retirada do procedimento operacional padrão (POP) de um laboratório de hematologia de grande porte, cujos profissionais chegaram a esse consenso após pesquisas bibliográficas e discussão entre os pares.

O neutrófilo bastonete é uma célula madura da linhagem granulocítica, com a forma do núcleo curvada ou em bastão, e que não desenvolveu um filamento de cromatina. Se a cromatina é vista na ponte que une os lóbulos, essa célula é um bastão, a não ser que o núcleo esteja sobreposto ou dobrado e que a constrição da parte mais estreita da ponte que une os lóbulos seja menor que dois terços da parte mais larga do núcleo. Neste caso, o neutrófilo deve ser classificado como segmentado.

No Capítulo 4, Qualidade em hematologia, descreve-se como fazer a comparação microscópica interobservadores da contagem diferencial de leucócitos com o auxílio da tabela de Rümke. A **Figura 3.18** mostra exemplos de neutrófilos segmentados, bastonetes e a concordância interobservadores encontrada em um estudo realizado por van der Meer e colaboradores.<sup>29</sup>

Os linfócitos atípicos ou reativos também são células que geram controvérsias em relação à classificação morfológica, uma vez que possuem grande variação de tamanhos, formas e intensidade da basofilia. A **Tabela 3.25** resume as principais características dos linfócitos atípicos ou reativos. Para mais detalhes, ver Capítulo 8, Série branca: leucograma.

O CLSI recomenda que os linfócitos sejam contados em qualquer quantidade e em todas as amostras. Dessa forma, o laudo do hemograma deve conter um campo específico para linfócitos atípicos.<sup>30</sup>



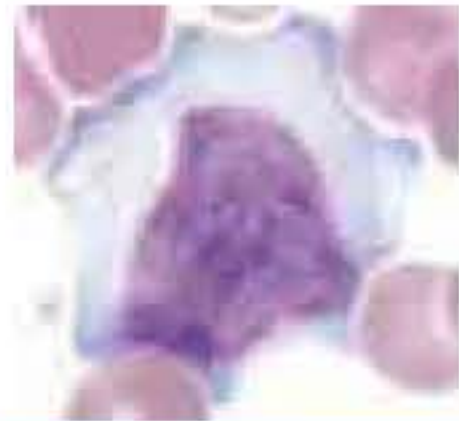


**FIGURA 3.18** Neutrófilos segmentados e bastonetes.

(A), 27 células com um acordo de > 75% para neutrófilo segmentado; (B), 14 com um acordo de > 75% para neutrófilo bastonete; (C), 32 células com acordo < 75% para segmentado ou bastonete.

Fonte: van der Meer e colaboradores.<sup>29</sup>



TABELA 3.25 Variações morfológicas dos linfócitos atípicos		
VARIAÇÕES DE LINFÓCITOS ATÍPICOS	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	
Monocitoide	Célula grande, núcleo convoluto, citoplasma abundante com basofilia variável, podendo apresentar vacúolos e grânulos. Apresenta morfologia semelhante ao monócito	
Plasmocitoide ou linfoblastoide	Possuem citoplasma escasso com basofilia difusa e geralmente intensa. O núcleo pode apresentar nucléolos. O formato lembra um plasmócito ou um linfoblasto	
Ameboide	Caracteriza-se por ter morfologia ameboide porque emite projeções citoplasmáticas irregulares que, muitas vezes, contornam os eritrócitos. O citoplasma apresenta-se basofílico, principalmente junto à membrana citoplasmática	

**CORREÇÃO DA CONTAGEM AUTOMATIZADA DE LEUCÓCITOS**

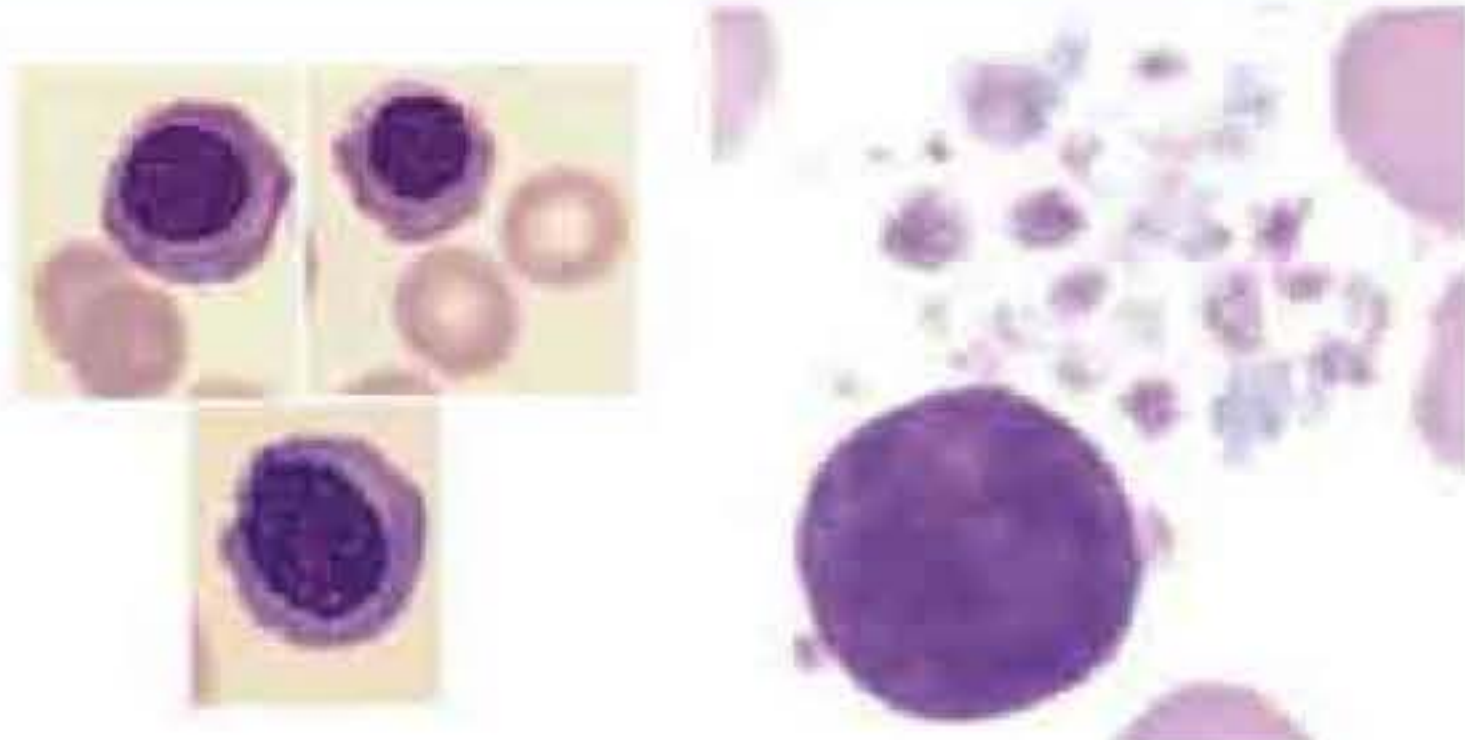
Sempre que a contagem de eritroblastos ou de fragmentos de núcleos de megacariócitos na lâmina for superior a 10/100 leucócitos contados, deve-se fazer a correção da contagem automatizada de leucócitos, uma vez que ambos são considerados como leucócitos na maioria dos analisadores hematológicos. A correção é realizada da seguinte forma:

$$\text{Leucócitos corrigidos} = \frac{\text{Leucometria Global} \times 100}{100 + \text{número de eritroblastos e/ou fragmentos de núcleo de megacariócito}}$$

No caso dos eritroblastos, tal procedimento não precisa ser realizado se o laboratório possuir analisadores hematológicos que contem eritroblastos nas amostras de sangue total. Nesses casos, o analisador já fornece a contagem de leucócitos corrigida. A **Figura 3.19** mostra eritroblastos e fragmentos de núcleo de megacariócitos.

**APRIMORANDO A MANEIRA DE LIBERAR OS RESULTADOS DO HEMOGRAMA**

A ênfase principal em emitir um resultado de hemograma é poder transmitir, em números e palavras para os profissionais que leem os resultados, os dados significativos observados na extensão sanguínea. O relatório deve ser redigido de forma clara e concisa. Não se deve assumir que o profissional que lê o resultado tenha total conhecimento do significado clínico de todas as alterações mor-



Eritroblastos

Fragmento de núcleo de megacariócito

**FIGURA 3.19** Eritroblastos e fragmentos de núcleo de megacariócitos.

Fonte: BloodLine Image Atlas<sup>31</sup> e Laborlexikon.<sup>32</sup>

fológicas descritas. Portanto, os profissionais do laboratório de hematologia devem ser encorajados a fixar comentários sobre os possíveis significados clínicos dos achados morfológicos mais importantes, assim como ações a serem tomadas.

Nas situações em que a lâmina está aparentemente normal, o comentário “a análise microscópica concorda com o resultado automatizado” poderia ser usado para sugerir que nenhuma informação adicional foi obtida a partir da avaliação da lâmina de sangue periférico. A **Tabela 3.26** apresenta alguns cenários morfológicos e exemplos de possíveis comentários que poderiam ser utilizados em situações em que a observação da lâmina de sangue periférico traz informações clinicamente relevantes.



TABELA 3.26 Achados do sangue periférico e contagens automatizadas e sugestões de comentários para serem relatados no hemograma	
ACHADO	SUGESTÃO DE COMENTÁRIO
Microcitose, hipocromia, eliptócitos, dacriócitos, codócitos e acantócitos	Sugere-se fazer estudos com ferro para excluir a sua deficiência e eletroforese de hemoglobina para excluir hemoglobinopatia
Dupla população eritrocitária	Uma combinação de eritrócitos microcíticos e normocíticos foi observada. Isso pode representar anemia ferropriva parcialmente tratada, transfusão de sangue e anemia sideroblástica. A correlação clínica e laboratorial se faz necessária
Esquistócitos e trombocitopenia	Sugestivo de processo hemolítico microangiopático com trombocitopenia. É necessária a correlação clínica e laboratorial para excluir CIVD, PTT, síndrome hemolítico-urêmica, síndrome HELLP, vasculite, infecção
Esferocitose	Sugere-se investigação de causas hemolíticas incluindo contagem de reticulócitos, bilirrubina, haptoglobina, LDH e Coombs direto. Reação transfusional ou esferocitose hereditária devem ser consideradas
Aglutinação eritrocitária	Sugere-se investigação de causas hemolíticas, incluindo contagem de reticulócitos, bilirrubina, haptoglobina, LDH, Coombs direto e pesquisa de crioaglutininas para acessar a importância desse achado
Rouleaux	Sugere-se realizar imunoeletroforese para pesquisar proteína monoclonal. Infecção e estado inflamatório devem ser excluídos
Queratócitos, policromatofilia, esquistócitos, entre outras mudanças oxidativas	Sugere-se investigação de causas hemolíticas, incluindo contagem de reticulócitos, bilirrubina, haptoglobina, LDH e Coombs direto. Pesquisa de corpos de Heinz deve ser realizada. Devem ser considerados deficiência de G6PD, medicamentos oxidantes, efeito de toxinas e presença de hemoglobinas instáveis
Neutropenia isolada	Sugere-se excluir processo infeccioso, efeito de medicação, processo imune, endocrinopatia e anormalidades da medula óssea
Macrocitose	Sugere-se excluir deficiência de ácido fólico e vitamina B <sub>12</sub> , efeito de medicação, doença hepática e da tireoide, uso de álcool, reticulocitose e anormalidades da medula óssea
Trombocitopenia isolada	Trombocitopenia sem agregados plaquetários e esquistócitos. Sugere-se excluir PTI, efeito de medicação, infecção, hiperesplenismo e anormalidades da medula óssea
Trombocitopenia com agregados plaquetários	Presença de agregados plaquetários na lâmina. Contagem automatizada de plaquetas prejudicada. Sugere-se solicitar nova amostra em citrato de sódio para confirmação da contagem de plaquetas
Linfocitose com atipia morfológica	Sugere-se excluir infecção viral e realizar imunofenotipagem para classificar subtipos de linfócitos
Trombocitose	Correlacionar clínica e laboratorialmente para causas reativas (deficiência de ferro, estados inflamatórios, pós-cirúrgico, infiltração medular e etc.) e causas primárias (doenças mieloproliferativas)
Codócitos, acantócitos e ponteados basófilos	Sugere-se excluir doença hepática, obstrução biliar e hemoglobinopatia
Ponteados basófilos grosseiros	Sugere-se excluir intoxicação por chumbo
Equinócitos	Sugere-se excluir doença renal, hipofosfatemia e causa artefactual
Blastos ≥ 20% das células do sangue periférico	Descrever os blastos quando necessário. Resultado consistente com leucemia aguda. Visualizar bastonetes de Auer, condizentes com leucemia mieloide aguda. Sugere-se correlacionar imunofenotipagem, mielograma e citogenética
Blastos ≤ 20% das células do sangue periférico	Descrever os blastos quando necessário. Esse resultado pode representar uma mielodisplasia, leucemia aguda, infiltração medular ou um processo reativo. Correlacionar achados clínicos com mielograma
Parasitas da malária	Especificar gênero e subespécie

CIVD, coagulação intravascular disseminada; PTT, púrpura trombocitopênica trombótica; LDH, desidrogenase láctica.  
Fonte: Adaptada de Barth.<sup>19</sup>



### AUTOMAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

A automação da leitura de lâminas de hemogramas tornou-se possível devido a novas tecnologias, como a digitalização das imagens de uma extensão sanguínea seguida de análise por redes neurais artificiais. A análise neural é um *software* instalado em um sistema automatizado digital para morfologia celular que analisa e identifica os diferentes subtipos de leucócitos, fornece a contagem diferencial, além de analisar e quantificar as alterações da série vermelha e das plaquetas. Os profissionais podem fazer a revisão morfológica das células na tela do computador da mesma forma como fariam em um microscópio. Na revisão dos leucócitos, podem ser feitas alterações quando as células não são identificadas corretamente ou, simplesmente, aceitar o diferencial digital. As alterações da série vermelha e das plaquetas são quantificadas em cruzes, conforme configuração estabelecida pelos usuários. Essa tecnologia possibilita melhoras na precisão do diferencial, aumenta a velocidade de leitura das lâminas, permite padronizar a leitura entre profissionais, além de diminuir o tempo de liberação dos resultados. Permite enviar pela rede (*e-mail*), células não identificadas eletronicamente para que outros profissionais em outros locais forneçam uma segunda opinião. Essa ação recebe o nome de tele-hematologia, ou seja, hematologia a distância. É possível, ainda, rastrear no banco de imagens do equipamento resultados anteriores de pacientes em nível celular individual, permitindo, por exemplo, visualizar determinadas células anteriormente ao início da quimioterapia citotóxica. Por fim, pode ser utilizado como ferramenta de ensino e aprendizagem pelo fato de bibliotecas digitais estarem incluídas em seu *software*. Entre os equipamentos que fazem a análise digital da lâmina, pode-se citar o CellaVision™ DM96 e o CellaVision™ DM1200 (Lund, Suécia). A aplicação desses equipamentos vai além do hemograma; inclui análise digital de líquidos biológicos e, até mesmo, medula óssea.<sup>31,32,33,34</sup> A **Figura 3.20** mostra, resumidamente, detalhes desse equipamento.

### CRITÉRIOS DE LIBERAÇÃO DE RESULTADOS DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS SEM A REVISÃO MICROSCÓPICA DA LÂMINA

Na hematologia laboratorial atual, devido às necessidades de redução de custos e do tempo de liberação dos resultados, tem havido um grande interesse em encontrar maneiras de diminuir a quantidade de resultados de hemogramas automatizados que devam ser revisados microscopicamente sem sacrificar a sua qualidade. O preparo, a coloração e a revisão microscópica das lâminas de hemogramas estão entre as tarefas mais demoradas do laboratório de hematologia, além de requererem elevada competência técnica dos profissionais envolvidos.

Os critérios de revisão têm por objetivo dar conformidade a resultados anômalos, verificando sua autenticidade mediante uma série de regras de decisão pré-definidas pelo laboratório, indicando a realização de ações, sendo a principal o preparo adequado de uma lâmina de sangue periférico para revisão microscópica e, conforme o caso, contagem diferencial manual de leucócitos.

A **Tabela 3.27** mostra uma série de critérios sugeridos para avaliar a necessidade de revisão microscópica dos resultados automatizados e também mostra ações que devem ser tomadas conforme o caso. Quando tais critérios são utilizados, a quantidade de resultados falsos negativos (não revisados microscopicamente, mas com alguma alteração morfológica relevante) não deve ultrapassar 5%, e a taxa de revisões microscópicas deve diminuir em pelo menos 30%.<sup>13,24</sup> É importante salientar que cada laboratório deve desenvolver e validar seus próprios critérios de revisão, levando em conta fatores intrínsecos de cada instituição no que diz respeito ao tipo de população atendida, achados microscópicos de significado clínico relevante e observações técnicas pertinentes. O trabalho de Barnes e colaboradores<sup>24</sup> fornece as diretrizes para se realizar a validação dos critérios de revisão de lâminas, de modo que cada laboratório possa, ao longo do tempo, ampliar os ranges de triagem e, mesmo assim, obter taxas de falsos negativos aceitáveis.



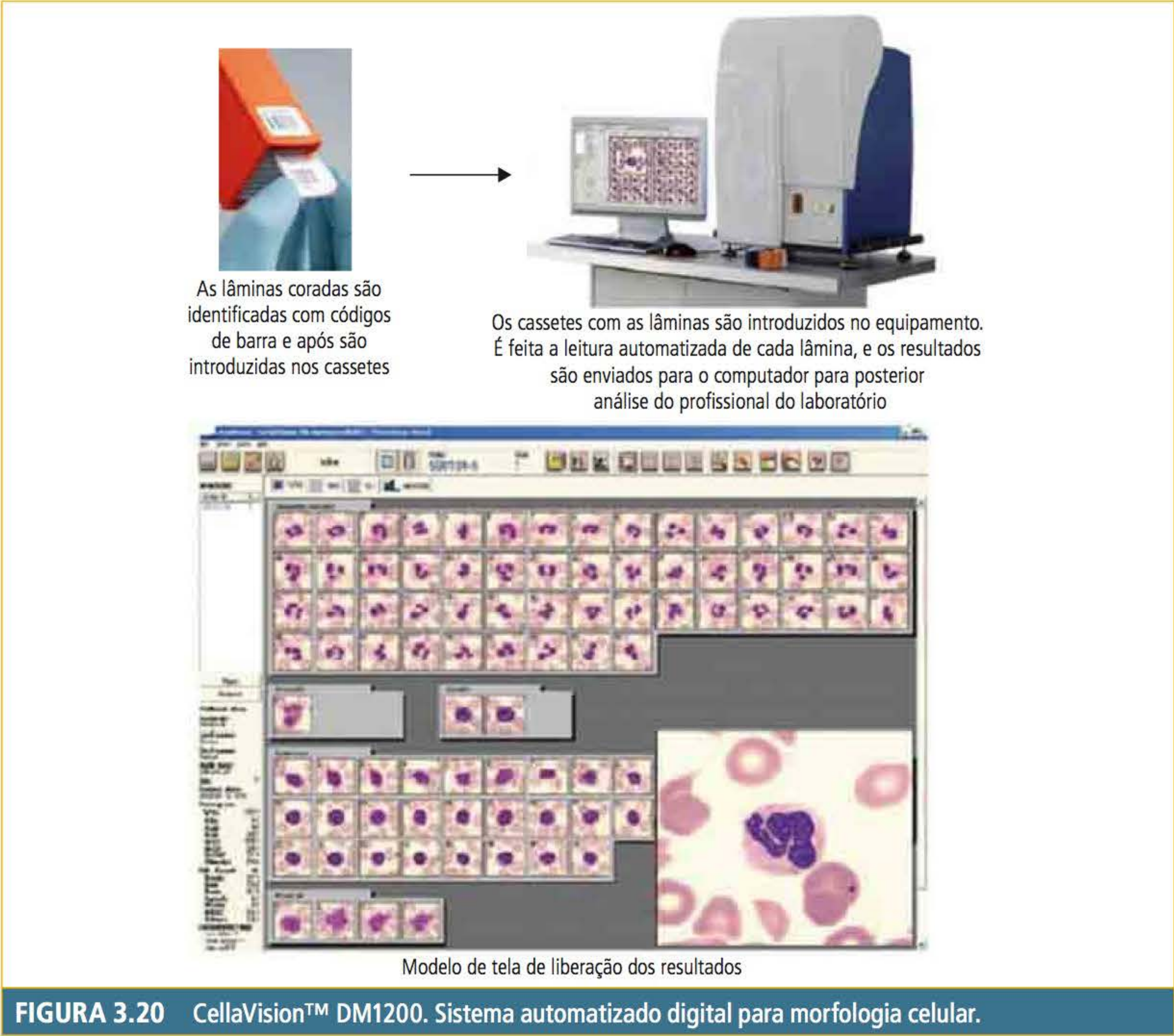


FIGURA 3.20 CellaVision™ DM1200. Sistema automatizado digital para morfologia celular.

Fonte: Cellavision.<sup>33</sup>

TABELA 3.27 Critérios sugeridos para revisão microscópica de resultados de hemogramas			
CRITÉRIO	PARÂMETRO	LIMITES PARA TRIAGEM	AÇÕES PROPOSTAS
1	Leucócitos	< 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μL ou >12,0 x 10 <sup>3</sup> /μL	Revisão microscópica da lâmina de hemograma (RMLH) e confirmar leucopenia ou leucocitose por meio de estimativa em lâmina  RMLH e, se necessário, CDLM
2	Neutrófilos #	< 1,8 x 10 <sup>3</sup> /μL ou > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μL	
3	Neutrófilos %	< 38% ou > 70%	
4	Linfócitos #	< 0,8 x 10 <sup>3</sup> /μL ou > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μL (adultos) e > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μL (crianças ≤ 12 anos)	
5	Linfócitos %	< 20% ou > 50%	
6	Monócitos #	< 0,1 x 10 <sup>3</sup> /μL ou > 1,3 x 10 <sup>3</sup> /μL (adultos) e > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μL (crianças ≤ 12 anos)	
7	Monócitos %	< 1% ou > 12%	
8	Eosinófilos #	> 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μL	
9	Eosinófilos %	> 20%	
10	Basófilos #	> 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μL	
11	Basófilos %	> 2%	

(continua)



TABELA 3.27 Critérios sugeridos para revisão microscópica de resultados de hemogramas (continuação)			
CRITÉRIO	PARÂMETRO	LIMITES PARA TRIAGEM	AÇÕES PROPOSTAS
12	Hemoglobina	< 9,5 g/dL ou > 18,0 g/dL	RMLH e verificar morfologia de série vermelha
13	VCM	< 77 fL (adultos) e < 74 fL (crianças até 12 anos) ou > 100 fL	RMLH e checar microcitose e macrocitose
14	CHCM	< 31,5 g/dL	RMLH, checar hipocromia e verificar tempo decorrido após coleta
15	CHCM	> 36,5 g/dL	RMLH, checar lipemia, hemólise, hiperleucocitose, aglutinação dos eritrócitos, relação sangue, anticoagulante e presença de esferócitos
16	RDW-CV	> 17,0%	RMLH e checar anisocitose
17	RDW-SD	> 65 fL	
18	Reticulócitos	> 0,150 x 10 <sup>6</sup> /µL ou > 2,5%	RMLH e checar policromatofilia
19	Plaquetas	< 100 x 10 <sup>3</sup> /µL ou > 600 x 10 <sup>3</sup> /µL	RMLH e estimar contagem de plaquetas na lâmina por método indireto para confirmar trombocitopenia ou trombocitose
20	VPM	< 5,0 fL ou > 12,0 fL	RMLH e checar tamanho e morfologia plaquetária
21	Flags suspeitos	<i>Immature Granulocytes</i> (Granulócitos imaturos – metamielócitos, mielócitos e pró-mielócitos)	RMLH e, se necessário, CDLM
		<i>Left shift</i> (Desvio nuclear à esquerda)	
		<i>Atypical Lymphocytes</i> (Linfócitos atípicos)	
		<i>Blasts</i> (Blastos)	
		<i>Nucleated Red Blood Cells</i> (Eritroblastos)	RMLH e, caso seja positivo, contar eritroblastos/100 leucócitos. Se ≥ 10%, corrigir contagem global de leucócitos
		<i>RBC Fragments</i> (Fragmentos eritrocitários)	RMLH e checar presença de esquistócitos
		<i>Dimorphic RBC Population</i> (Dupla população de eritrócitos)	Checar gráfico de distribuição de volume eritrocitário, observar valor de RDW e verificar anisocitose na lâmina
		<i>RBC Lyse resistance</i> (Eritrócitos resistentes à lise)	Passar novamente a amostra e, caso seja positivo, fazer revisão microscópica da lâmina e checar se há morfologia eritrocitária anormal
		<i>Platelet Clumps</i> (Agregados plaquetários)	Checar presença de coágulos na amostra e agregados plaquetários na lâmina
		<i>Turbidity/HGB Interference</i> (Interferência na dosagem de hemoglobina devido à turbidez da amostra)	Checar lipemia na amostra. Se a amostra for lipêmica, retirar o plasma e substituí-lo por igual parte de solução salina ou diluente do analisador e passá-la novamente. Considerar apenas a hemoglobina e refazer o cálculo das constantes eritrocitárias
		<i>Large platelets</i> (Plaquetas gigantes ou macroplaquetas)	Checar presença de plaquetas gigantes e macroplaquetas na lâmina
22	TODOS	Se for recém-nascido	Fazer RMLH e CDLM
23	(*) e (---)	Esses sinais, ao lado das contagens, indicam, respectivamente, que os resultados da contagem diferencial não são confiáveis ou que a contagem diferencial não está disponível para a amostra em questão	

(continua)



TABELA 3.27 Critérios sugeridos para revisão microscópica de resultados de hemogramas (continuação)			
CRITÉRIO	PARÂMETRO	LIMITES PARA TRIAGEM	AÇÕES PROPOSTAS
24	TODOS	Limites de <i>Delta Check</i> extrapolados	RMLH e, se necessário, CDLM  Cada laboratório deve avaliar a possibilidade de implantação das regras de <i>Delta Check</i> em virtude da complexidade de implantação das mesmas no sistema de informação do laboratório

CDLM, contagem diferencial de leucócitos manual; RMLH, revisão microscópica da lâmina de hemograma.  
**Fonte:** Adaptada de Peterson e colaboradores,<sup>13</sup> Barnes e colaboradores,<sup>24</sup> Gulati e colaboradores,<sup>34</sup> Comar e colaboradores.<sup>35</sup>

REFERÊNCIAS

1. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med*. 2005;353(5):498-507.

2. Houwen B. Blood film preparation and staining procedures. *Clin Lab Med*. 2002;22(1):1-14.

3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference leukocyte (WBC) differential count (Proportional) and evaluation of instrument methods: approved standard. 2nd ed. Wayne: CLSI; 2007.

4. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. Hematologia laboratorial. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.

5. Bain BJ, Lewis SM. Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. In: Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. *Dacie and Lewis practical haematology*. 11th ed. China: Elsevier Churchill Livingstone; 2012.

6. Maedel LB, Doig K. Examination of the peripheral blood film and correlation with the complete blood count. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. *Hematology: clinical principles and applications*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2012.

7. Shafer J. Preparation of blood films for examination. In: Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. *Clinical hematology: principles, procedures, correlations*. 2nd ed. New York: Lippincott-Raven; 1998.

8. Simson E, Gasgon-Lema M, Brown D. Performance of automated slidemakers and stainers in a working laboratory environment – routine operation and quality control. *Int J Lab Hematol*. 2010;32(1):64-76.

9. Pierre RV. Peripheral blood film review: the demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med*. 2002;22(1):279-97.

10. Pierre RV. Red cell morphology and the peripheral blood film. *Clin Lab Med*. 2002;22(1):25-61.

11. Romanowsky DL. Zur frage der parasitology und therapie der malaria. *St Peters Med Wochenschr*. 1891;16:297-302.

12. Woronzoff-Dashkoff KK. The wright-giemsa stain: secrets revealed. *Clin Lab Med*. 2002;22(1):15-23.

13. Peterson P, McNeill S, Gulati G. Cellular morphologic analysis of peripheral blood. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, editors. *Laboratory hematology practice*. Singapore: Wiley-Blackwell; 2012.

14. Oliveira RAG, Neto AP. Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais. São Paulo: Roca; 2004.

15. Marshall PN, Bentley SA, Green FJ. Romanowsky blood stains. Proposed standard. Villanova: NCCLS; 1986.

16. Wittekind D, Löhr W. Purification, standardization and quality control of romanowsky dyes. In: Lewis SM, Coster JF. *Quality control in haematology*. London: Academic; 1975.

17. Comar SR. Como fazer o controle de qualidade dos corantes utilizados em Hematologia e com que frequência? In: Martinho MSC. *Hematologia em laboratório clínico*. São Paulo: Sarvier; 2012.

18. Gulati GL, Bourne S, EL Jamal SM, Florea AD, Gong J. Automated lymphocyte counts vs manual lymphocyte counts in chronic lymphocytic leukemia patients. *Lab Med*. 2011;42(9):545-8.

19. Barth D. Approach to peripheral blood film assessment for pathologists. *Semin Diagn Pathol*. 2012;29(1):31-48.

20. Comar SR, Danchura HSM, Silva PH. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(6):431-6.

21. Escobar M, Rappaport E, Tipton P, Balentine P, Riggs M. Reticulocyte estimate from peripheral blood smear: a simple, fast, and economical method for evaluation of anemia. *Lab Med*. 2002;33(9):703-5.

22. Lewis SM. Blood film evaluations as a quality control activity. *Clin Lab Haematol*. 1990;12(1):119-27.

23. Tkachuk DC, Hirschmann JV. Approach to the microscopic evaluation of blood and bone marrow. In: Tkachuk DC, Hirschmann JV, editors. *Wintrobe's atlas of clinical hematology*. Marceline: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

24. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol*. 2005;11(2):83-90.

25. Gulati G. Red cell morphology. In: Gulati G. *Blood cell morphology: grading guide*. Hong Kong: ASCP; 2009.

26. Walters JG, Garrity PF. RDW-SD and RDW-CV: their relationship to RBC distribution curves and anisocytosis. *Sysmex J Int*. 1993;3(1):40-5.

27. Comar SR. Existe mais de um tipo de RDW e quais as diferenças? In: Martinho MSC. *Hematologia em laboratório clínico*. São Paulo: Sarvier; 2012.

28. O'Connor BH. Color atlas and instruction manual of peripheral blood cell morphology. Pennsylvania: Williams & Wilkins; 1984.

29. van der Meer W, van Gelder W, de Keijzer R, Willems H. Does the band cell survive the 21st century? *Eur J Haematol*. 2006;76(3):251-4.



30. Fleury MK. Como relatar as alterações encontradas na análise microscópica da série branca? Como mensurá-las? In: Martinho MSC. Hematologia em laboratório clínico. São Paulo: Sarvier; 2012.
31. BloodLine Image Atlas [Internet]. [S.l.]: BoodLine; c2010 [capturado em 24 abr 2015]. Disponível em: <http://image.bloodline.net/>.
32. Laborlexikon. Liebe freunde und besucher des laborlexikons [Internet]. [S.l.]: Laborlexikon; 2014 [capturado em 24 abr 2015]. Disponível em: <http://www.laborlexikon.de/>.
33. CellaVision [Internet]. Grønlandsleiret: CellaVision; c2015 [capturado em 01 jul 2015]. Disponível em: <http://cellavision.com/>.
34. Gulati GL, Alomari M, Kocher W, Schwarting R. Criteria for blood smear review. Lab Med. 2002;33(5):374-7.
35. Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R. Are the review criteria for automated complete blood counts of the International Society of Laboratory Hematology suitable for all hematology laboratories? Rev Bras Hematol Hemot. 2014;36(3):219-25.

### Leituras sugeridas

- Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, et al. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system. Int J Lab Hematol. 2009;31(1):48-60.
- Cornet E, Perol JP, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. Int J Lab Hematol. 2008;30(6):536-42.
- Hsu D, Lee SH. Digital imaging in hematology. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, editors. Laboratory hematology practice. Singapore: Wiley-Blackwell; 2012.
- Riedl JA, Dinkelaar RB, van Gelder W. Automated morphological analysis of cells in body fluids by the digital microscopy system DM96. J Clin Pathol. 2010;63(6):538-43.





Os laboratórios de análises clínicas vêm realizando, há mais de 150 anos, serviços essenciais no apoio à prática médica no Brasil, sobretudo pelos resultados dos exames laboratoriais terem grande influência na conduta diagnóstica e terapêutica dos pacientes. Contudo, hoje, os laboratórios clínicos estão rapidamente se transformando em linhas de produção de exames, devido à elevada taxa de automatização dos processos, que é impulsionada, principalmente, pela rapidez de execução dos exames e pela diminuição geral dos custos dos testes. Isso é alcançado pela implantação de diversas funções analíticas em estações de trabalho individuais que são operadas com mínima supervisão humana. Tal fato visa tornar os laboratórios cada vez mais eficientes e competitivos perante o mercado da medicina laboratorial.<sup>1,2</sup>

Toda essa transformação, apesar de trazer benefícios, como a padronização de métodos e diminuição do erro humano em função do trabalho intenso e repetitivo, caso não seja devidamente controlada por profissionais capacitados, poderá reduzir a qualidade dos serviços laboratoriais. Entre os fatores que podem comprometer a qualidade, incluem-se a formação de fusões entre grandes laboratórios, a diminuição do número de funcionários concomitante ao aumento da carga de trabalho, pouca ênfase na formação de especialistas e baixos salários, que ocasionam alta taxa de flutuação dos profissionais e contratação de funcionários temporários que, muitas vezes, não desenvolvem uma relação substancial de comprometimento com o trabalho.

Na atual conjuntura em que se inserem os laboratórios de hematologia, há a necessidade de profissionais comprometidos e que reciclem e aprofundem seus conhecimentos no intuito de saber o momento certo de se fazer uma intervenção humana nos equipamentos ou complementar informações fornecidas pela automação.

O que jamais pode ser deixado em segundo plano pelos laboratórios é a obrigação ética de produzir dosagens e determinações confiáveis e reprodutíveis, de acordo com boas práticas laboratoriais que garantam o fornecimento de resultados inequívocos e relevantes para o problema clínico em questão. Há também uma obrigação moral no sentido de possibilitar o avanço na carreira dos profissionais do laboratório por meio de capacitações, pesquisas e contato com inovações tecnológicas, proporcionando saúde, segurança e satisfação pessoal no decorso laboral. Todas essas intenções representam boas práticas de laboratório, e os mecanismos para alcançá-las devem ser considerados na gestão da qualidade.<sup>1</sup>

A automação no setor de hematologia vem crescendo substancialmente nos últimos anos, e os fabricantes oferecem cada vez mais funções em seus analisadores hematológicos, tais como autoverificação de resultados, facilidade de manutenção e protocolos de interfaceamento simplificados. Essas funções contribuem para diminuir a interação humana com os analisadores, assim como a taxa de revisões microscópicas, a fim de facilitar o fluxo de trabalho e diminuir o tempo de liberação dos resultados.



A interferência humana deve ser direcionada para a verificação dos resultados gerados pelos analisadores hematológicos, para uma correta avaliação do controle interno de qualidade, para tomadas de decisão com base na análise de regras pré-definidas, para verificação e análise das características de desempenho analítico dos contadores, para a participação em programas de avaliação externa de qualidade e, principalmente, para “conversa” entre o profissional do laboratório e os analisadores hematológicos, conversa esta que é realizada no momento da revisão microscópica e quando o observador confirma e complementa informações fornecidas pelos analisadores, garantindo que estas sejam pertinentes e relevantes para a conduta médica por meio de um resultado de alta qualidade.

### COMO ESCOLHER O ANALISADOR HEMATOLÓGICO IDEAL

Atualmente, a situação ideal é que o laboratório de hematologia tenha um analisador hematológico que faça a diferencial de leucócitos em 5 partes, que forneça o valor de RDW, forneça as constantes plaquetárias e realize a contagem automatizada de reticulócitos. Essa situação ideal não é possível em muitos laboratórios de análises clínicas devido à relação entre custo e benefício. Os laboratórios se deparam, atualmente, com uma oferta muito grande de aparelhos no mercado, tornando a escolha do analisador adequado para a rotina um processo trabalhoso. Tal processo já está englobado na gestão da qualidade, que envolve pesquisa sobre as características técnicas do aparelho e que demanda tempo. Em contrapartida, tem a vantagem de não gerar problemas e arrependimentos futuros, caso a escolha seja bem feita. O **Quadro 4.1** traz critérios gerais que devem ser seguidos para a escolha do analisador hematológico.

O primeiro critério se refere ao tipo de serviço que o laboratório atende. Se um serviço de oncologia faz parte do atendimento laboratorial, o aparelho deve estar capacitado a contar, com eficiência, valores, muitas vezes, bastante diminuídos de leucócitos e plaquetas nos pacientes em tratamento quimioterápico. Dependendo do tipo de atendimento, pode ser importante que o aparelho esteja capacitado a realizar a contagem automatizada de reticulócitos ou fazer a contagem de células CD4 e CD8. Nesse critério, o laboratório deve estabelecer

#### QUADRO 4.1 Critérios que devem ser seguidos para a escolha do aparelho de automação

1. Aparelho de automação x clientela do laboratório
2. Número de hemogramas/dia x amostras/hora do aparelho
3. Relação custo/benefício
4. Controle de qualidade
5. Instalação do aparelho
6. Assistência técnica
7. Interfaceamento
8. Capacitação dos funcionários
9. Funcionalidade e facilidades

o perfil laboratorial em função dos serviços que ele atende. Além disso, deve-se levar em conta as possibilidades futuras de atendimento do laboratório.

O segundo critério considera quantos hemogramas o setor de hematologia realiza diariamente e qual a capacidade do equipamento (amostras/hora). Também devem ser levadas em consideração as possibilidades futuras de expansão do atendimento do laboratório.

A relação custo/benefício deve ser analisada em dois aspectos: o primeiro deve levar em conta o custo dos reativos, dos controles diários e calibradores e das manutenções de que o aparelho necessita. A partir disto, calcula-se o custo de cada hemograma realizado pelo aparelho. O segundo aspecto se refere aos objetivos que o laboratório pretende alcançar com a aquisição do analisador hematológico: somente agilizar a rotina, ter novos parâmetros para melhorar a qualidade pós-analítica do hemograma, divulgar de novos parâmetros junto aos clínicos e clientes ou agilizar a rotina para poder implantar técnicas hematológicas até então não realizadas.

O controle de qualidade do aparelho se refere aos controles diários (normal, alto e baixo) e aos calibradores. Neste item, deve ser investigado se o fabricante fornece estes controles. Outro item muito importante é a instalação do aparelho, em que deve ser verificada a qualidade da rede elétrica que vai alimentar o aparelho, a qual deve possuir aterramento para evitar que ruídos na rede elétrica interfiram nas contagens. Deve-se garantir temperaturas adequadas para o bom funcionamento do analisador, de modo a não provocar interferências nas contagens e nos mecanismos hidráulicos e pneumáticos do equipamento. O acondicionamento adequado dos reagentes utilizados também se faz necessário para evitar deterioração dos mesmos. O local físico onde o aparelho será



instalado deve respeitar a necessidade de ventilação, a incidência de luz solar direta e a quantidade de poeira a que o contador estará sujeito. Este item mostra se o local onde o aparelho será instalado preenche os pré-requisitos exigidos pelo fabricante do equipamento. O aparelho deve ser instalado por um técnico credenciado pelo fabricante e o mesmo deve fornecer, no laudo de instalação e calibração, detalhes de que o local onde o aparelho foi instalado estava de acordo com as exigências do fabricante. Esse laudo é importante para que, em casos de problemas futuros, as condições de instalação do aparelho não possam ser contestadas pelo fabricante.

A assistência técnica deve ser analisada quanto à eficiência do atendimento, em termos de número de técnicos disponíveis, reposição de peças e quanto ao custo da assistência. Saber se existe ou não um contrato de assistência técnica preventiva e quais são suas vantagens. É interessante que o laboratório entre em contato com laboratórios que adquiriram o aparelho pretendido e que seja feito um questionamento sobre a assistência técnica. Nesse questionamento, pode-se perguntar, também, o desempenho do aparelho de um modo geral.

Hoje, todo e qualquer analisador hematológico deve ser compatível com sistemas de interfaceamento pelo fato de se poder aumentar a produtividade e diminuir o tempo de liberação dos resultados sem expô-los a erros de digitação.

Os profissionais do setor de hematologia devem ser devidamente capacitados pelo fornecedor do aparelho a fim de operá-los adequadamente. Isso inclui a passagem das amostras sanguíneas da rotina diária, as manutenções periódicas (diária, semanal e mensal, dependendo do analisador hematológico), o controle de qualidade e, por fim, a capacidade de interpretar os resultados fornecidos, correlacionando-os com os histogramas e citogramas liberados pelo analisador e, principalmente, a utilização dessa gama de informações nas revisões das extensões sanguíneas. Pode-se, ainda, fazer vários questionamentos sobre o analisador para facilitar a vida do operador e dos profissionais que farão a liberação dos resultados, conforme **Quadro 4.2**.

Pelo que foi descrito, fica claro que o trabalho de adequar um contador à rotina do laboratório é árduo em função da gama de aparelhos que existe no mercado; contudo, há vantagem de tranquilidade futura.<sup>5</sup>

#### QUADRO 4.2 Características dos analisadores que devem ser questionadas a fim de facilitar a operação do analisador e a interpretação dos resultados

- Quão fácil e amigável é o sistema operacional do analisador em relação a outros analisadores que estão sendo avaliados?
- Quais problemas podem surgir decorrentes das avaliações internas das características do analisador?
- Quão grande é o nível de ruído e de calor gerados pelo analisador em relação a outros analisadores que estão sendo avaliados?
- Os alertas morfológicos (*flags*) são fáceis de interpretar?
- A análise dos controles é de fácil operação e visualização?
- Quão rapidamente consegue-se recuperar resultados armazenados na memória do analisador?
- É fácil e rápida a utilização do analisador em grandes rotinas?
- Pode-se interromper facilmente o analisador para que amostras de urgência e emergência sejam priorizadas?
- A mudança do modo fechado para o aberto é rápida ou pode atrasar a rotina?
- As *racks* são fáceis de manusear com relação a carregar e descarregar os tubos?
- É possível carregar tubos de diferentes tamanhos nas *racks* do sistema fechado?
- É fácil rastrear amostras após serem analisadas, no caso de precisar repetir a análise, confeccionar uma lâmina ou disponibilizar o material para outro teste?
- Ocorrem muitos problemas de congestionamento de *racks* no modo fechado (*autosampler*)?
- É fácil revisar as amostras na tela de dados armazenados do analisador?
- É possível transmitir várias amostras ao mesmo tempo dos dados armazenados para o programa de interfaceamento ou para impressão?
- Quantos códigos de barra não são lidos em uma bateria de amostras analisadas? É possível corrigir ou editar a identificação dos pacientes?
- Amostras com pouco volume são detectadas? Como o operador é notificado desses casos?
- As manutenções são fáceis de serem realizadas?
- Há riscos de contaminação do operador durante as manutenções?
- O manual do analisador possui instruções para resolução de problemas?
- O analisador possui mensagens de ações corretivas em seu *software*?
- O *software* do analisador tem a capacidade de realizar *DELTA CHECKS* nos resultados dos pacientes?
- O analisador hematológico pode contar com precisão e exatidão amostras com contagens baixas de leucócitos, as quais podem ser encontradas em pacientes em tratamento de leucemias?
- O analisador pode distinguir a diferença entre leucócitos, eritroblastos e fragmentos de núcleo de megacariócitos? Se distinguir, ele corrige a contagem de leucócitos?

**Fonte:** Adaptado de Moser e colaboradores<sup>3</sup> e Veillon e colaboradores.<sup>4</sup>

No laboratório de hematologia, o controle de qualidade é um conjunto de práticas projetadas para monitorar o desempenho de um sistema



analítico ao longo do tempo, de modo a detectar erros que ocorrem nas análises e prevenir a liberação de resultados incorretos. Além disso, tais práticas possibilitam garantir que os resultados dos pacientes sejam válidos e possam ser usados com confiança pelos médicos na tomada de decisões diagnósticas e terapêuticas. Cerca de 70% das decisões clínicas são feitas com base em resultados laboratoriais, implicando na necessidade de resultados confiáveis. Tal confiabilidade requer vigilância e esforços por parte da equipe laboratorial.

O controle de qualidade está inserido na garantia da qualidade, sendo essa última um termo amplo, que engloba as variáveis pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas. As práticas de qualidade da fase analítica incluem validação de ensaios e equipamentos, determinação, monitoramento e manutenção da precisão e exatidão de um método (controle interno e externo), além do estabelecimento de procedimentos para manter ou melhorar o nível da qualidade desejada (especificações da qualidade). Para os analisadores hematológicos, estão incluídas abordagens para assegurar a qualidade analítica, tais como a análise de amostras retidas dos pacientes, a média móvel dos pacientes, bem como o uso de controles comerciais. Cada um desses processos tem certas vantagens e desvantagens em termos de praticidade e capacidades de detecção de erros. Os principais tipos de erros que ocorrem nos analisadores hematológicos e coagulômetros são o erro sistemático e o erro randômico.

### AVALIAÇÃO DE EQUIPAMENTOS HEMATOLÓGICOS

Escolher um novo equipamento, quando há necessidade de trocar o atual, é uma decisão muito importante, e a validação dos resultados de qualquer equipamento novo é essencial. Tudo isso para verificar as especificações técnicas dos analisadores e a confiabilidade dos resultados reportados, a fim de aprovar o equipamento para o trabalho. A validação de equipamentos hematológicos é composta de procedimentos para determinar a inexatidão, a imprecisão intra e interensaio, imprecisão entre sistemas analíticos, especificidade, sensibilidade, linearidade, arraste, correlação, estabilidade e ação de interferentes e deve ser feita não somente na troca de equipamentos, mas sim periodicamente ou no retorno do equipamento de uma manutenção. Em analisadores hematológicos,

podem ser incluídas, ainda, as comparações entre o módulo aberto e o fechado, correlação do equipamento novo com a microscopia e avaliação dos alertas morfológicos das séries vermelha e branca e das plaquetas. A **Tabela 4.1** resume os procedimentos de validação de equipamentos hematológicos e de coagulação prévios à liberação dos mesmos para a rotina laboratorial.

Quando se interpreta os resultados das amostras dos pacientes, é importante saber sobre a possível ocorrência de erros randômicos ou imprecisão analítica dos resultados fornecidos, independentemente de os resultados poderem ser influenciados pela variabilidade biológica do paciente em estado de saúde normal ou patológico. A avaliação do desempenho analítico de analisadores hematológicos é uma ação que deve ser realizada em todos os laboratórios, principalmente naqueles que possuem um alto volume de amostras com contagens celulares muito altas ou muito baixas e que atendem populações com possibilidade potencial de apresentar alterações hematológicas relevantes.<sup>6-10</sup>

### DEFINIÇÕES E CONCEITOS RELACIONADOS COM CONTROLE DE QUALIDADE EM LABORATÓRIOS CLÍNICOS

O **Quadro 4.3** mostra uma série de termos e conceitos relevantes e aplicados à garantia da qualidade em laboratórios de análises clínicas.

Para facilitar o entendimento de como utilizar as regras de controle de qualidade no laboratório de hematologia, que serão apresentadas na sequência, é importante compreender graficamente como o erro sistemático, o erro randômico e o erro total são visualizados. A **Figura 4.1** mostra essa relação.

Para exemplificar, pode-se utilizar a dosagem de hemoglobina, supondo que o valor alvo real do teste seja  $\mu = 15 \text{ g/dL}$ , obtido por meio de ensaio de proficiência. Ao longo de vários dias, foi passado diariamente tal controle no analisador hematológico, e no final do lote do controle, determinou-se a média e o coeficiente de variação da dosagem de hemoglobina. O resultado observado foi: média =  $X_m = 15,5 \text{ g/dL}$  e coeficiente de variação de 2%. As dosagens variaram 2% ao redor da média, e essa variação reflete o erro randômico. A diferença entre  $\mu$  e  $X_m$  foi de  $0,5 \text{ g/dL}$  ou 3,3% e indica o afastamento da média dos resultados em relação ao va-



TABELA 4.1 Procedimentos de validação de analisadores hematológicos e de coagulação			
TESTE	DESCRIÇÃO	NÚMERO DE AMOSTRAS NECESSÁRIAS	PROCEDIMENTO
Imprecisão intraensaio ou repetitividade (curto prazo ou intracorrida)	Análises repetidas de amostras de pacientes ou de controles comerciais	3 amostras com níveis baixo, normal e alto dos analitos em questão	Analisar cada amostra pelo menos 10 vezes dentro de um curto espaço de tempo (< 1 hora)
Imprecisão interensaios ou reprodutibilidade (médio prazo ou intercorrida)	Análises repetidas de amostras de pacientes ou de controles comerciais	3 amostras com níveis baixo, normal e alto dos analitos em questão	Analisar cada amostra pelo menos 10 vezes dentro de 12 horas
Imprecisão interensaios ou reprodutibilidade (longo prazo ou interdia)	Análises repetidas de controles comerciais	2 ou 3 níveis de controles	Analisar as amostras durante pelo menos 10 dias ou até terminar o lote do controle
Linearidade	Análise de diluições seriadas de um analito em altas concentrações para determinar o intervalo analítico de medição	Amostras com valores elevados dos analitos em questão	Analisar as amostras logo após as diluições serem feitas
Sensibilidade analítica	Análise de diluições seriadas de um analito para determinar a exatidão e precisão em limites baixos	Podem ser utilizadas várias amostras para cobrir todos os parâmetros da rotina	Analisar as amostras logo após as diluições serem feitas
Sensibilidade clínica dos alertas morfológicos	Selecionar amostras da rotina e verificar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência do alerta morfológico em questão	Pelo menos 500 amostras representativas do dia a dia de trabalho do setor de hematologia	As amostras devem ser selecionadas dentro de 1 semana
Estudos de correlação com o método de referência	As amostras devem ser analisadas por métodos de referência ou no analisador referência e naquele que será implantado	Pelo menos 100 amostras	As amostras devem ser recolhidas dentro de um período de 20 dias
Estabilidade	Amostras de pacientes normais e doentes devem ser armazenadas apropriadamente e analisadas sequencialmente para determinar o maior período de tempo que as amostras podem ser armazenadas e analisadas	Pelo menos 10 amostras	Até os resultados mostrarem grandes diferenças entre si
Arraste	Análise de uma amostra com elevada concentração de um determinado analito seguida da análise de uma amostra com baixa concentração do analito	Pelo menos 3 amostras	As amostras devem ser analisadas no mesmo dia
Estudos de interferentes	Aumentar a concentração de possíveis interferentes (hemólise, lipemia, relação sangue/anticoagulante)	Depende das concentrações das substâncias interferentes a serem testadas	As amostras devem ser analisadas no mesmo dia

**Nota:** os resultados obtidos na validação devem ser julgados em comparação com os valores especificados nos manuais dos equipamentos ou em literaturas específicas ou especificações com base na variação biológica.

QUADRO 4.3 Termos e definições aplicados à garantia da qualidade	
TERMO	DEFINIÇÃO
Controle de qualidade	Inclui procedimentos estatísticos e não estatísticos realizados diariamente e estratégias para garantir que os resultados sejam precisos e exatos de modo a fornecer interpretações corretas
Erro randômico	Erro que ocorre em um sentido positivo e/ou negativo e cuja ocorrência, direção e magnitude não podem ser previstas. É sinônimo de imprecisão

(continua)



QUADRO 4.3 Termos e definições aplicados à garantia da qualidade (continuação)	
TERMO	DEFINIÇÃO
Erro sistemático	É um erro que ocorre em determinado sentido (uma mudança sistemática) entre um valor observado e o valor real do analito. Pode ser o mesmo ao longo de um intervalo de medições (bias constante) ou alterado conforme mudanças na concentração de um analito (viés proporcional)
Erro total	Erro randômico + erro sistemático
Erro total permitido	É um requisito de qualidade analítica que coloca um limite para a quantidade de erros aleatórios e sistemáticos tolerados para a determinação de um teste. O erro total permitido deve refletir o grau de variação que deve ser detectado de modo a não influenciar na tomada de decisão clínica. Deve ser determinado para cada parâmetro individual
Especificações da qualidade	Requisitos do processo analítico para garantir que os resultados produzidos pelo laboratório atendam a um nível de qualidade desejado. Correlaciona-se com erro total permitido, erro randômico e erro sistemático
Especificidade analítica	A capacidade de um teste ou método para determinar a concentração de um determinado analito, independente da presença em potencial de substâncias interferentes
Exatidão	A exatidão é a medida de concordância entre um valor estimado e o valor real. Exatidão não possui valor numérico e é determinada como a quantidade de inexactidão. A inexactidão pode ser definida como a extensão do erro entre a média de um grupo de replicatas e o valor real do resultado. Essa diferença pode ser positiva ou negativa e pode ser expressa em valor absoluto ou porcentagem em relação ao valor real. Pode ser verificada pelo uso de materiais de referência. É o oposto de erro sistemático ou inexactidão
Garantia da qualidade	É o conjunto de metas de qualidade que se preocupa com todos os aspectos de desempenho do laboratório. Inclui planejamento da qualidade, implementação, monitoramento e avaliação, com o objetivo de proporcionar um ambiente de melhoria contínua da qualidade. Engloba todos os aspectos das fases analítica e extra analítica
Gráficos de controle	É um método gráfico para exibir os resultados do controle em que os resultados são representados em função do tempo de execução. São traçadas linhas de ponto a ponto para acentuar as tendências, mudanças sistemáticas ou randômicas. O gráfico de controle é comumente conhecido como gráfico de Levey-Jennings
Precisão	A capacidade de um teste ou método em obter o mesmo resultado quando a amostra é analisada várias vezes. É o oposto de erro aleatório ou imprecisão. A precisão é estimada por meio de estudos de replicação e é muitas vezes expressa como o coeficiente de variação (CV em %) de um teste ou método
Range analítico	O intervalo de resultados numéricos que um método pode produzir sem que haja manipulação da amostra como, por exemplo, diluições. Também pode ser definido como o intervalo de concentração da substância na amostra para o qual o desempenho do método é confiável e os resultados dos testes podem ser reportados com segurança
Regras de controle	Significa um critério de decisão para julgar se uma corrida analítica está dentro ou fora de controle. São representadas no formato $A_L$ , onde A representa o número de medições feitas com o controle e L identifica os limites do controle. Exemplo: $1_{2s}$ significa que 1 medição saiu 2 desvios padrão em relação à média alvo do controle
Sensibilidade analítica	A capacidade de um teste ou método para avaliar pequenas variações da concentração de um analito. O uso desse termo é controverso e tem sido usado por alguns autores como sinônimo de limite de detecção

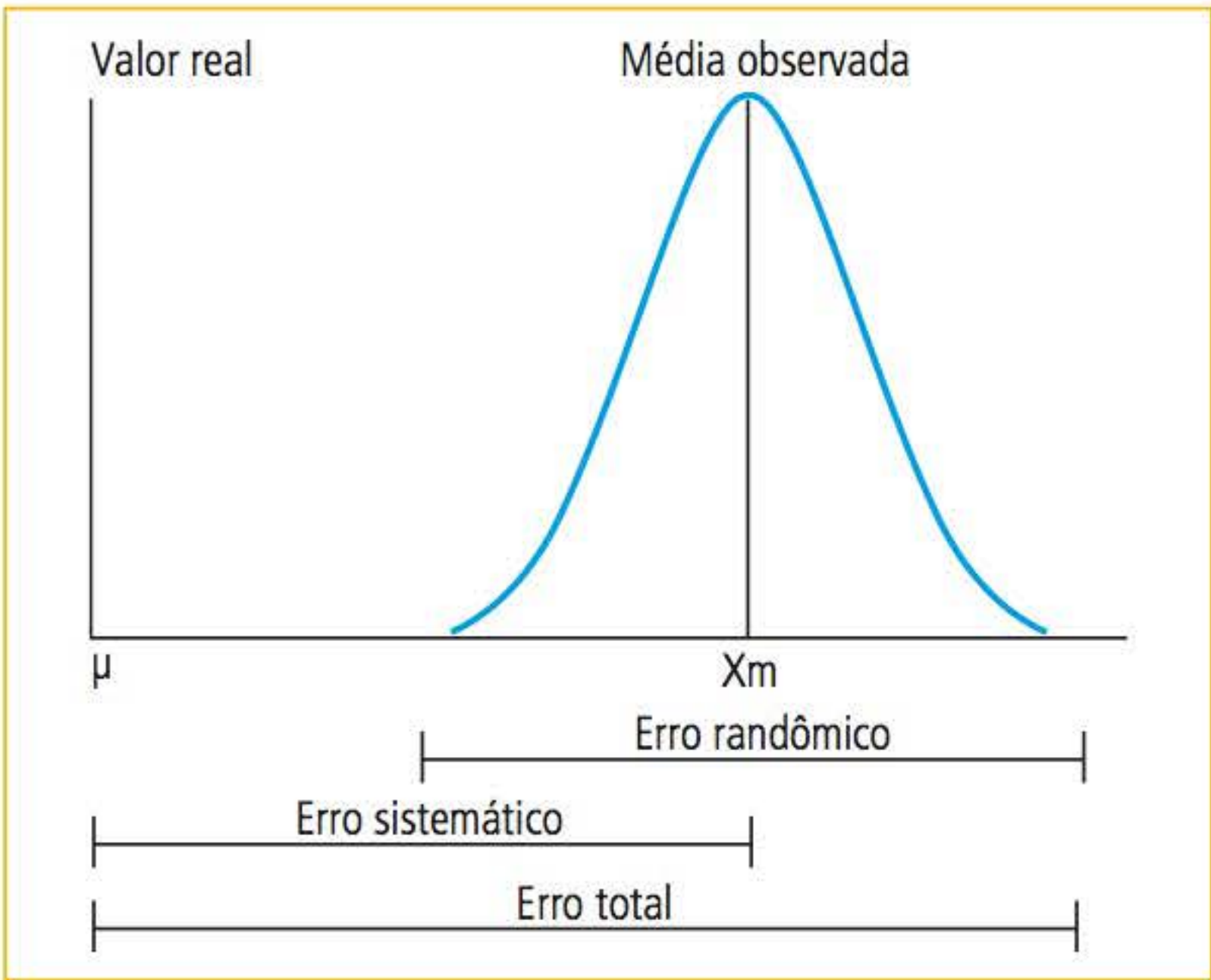


FIGURA 4.1 Demonstração gráfica do erro total, erro randômico e erro sistemático.

lor alvo desejado. Tal afastamento reflete o erro sistemático, que, nesse caso, possui um desvio analítico positivo. A soma do erro randômico e do erro sistemático nos fornece o erro total. Contudo, o erro randômico deve ser corrigido para o nível de confiança desejado conforme segue:

ET = ES + z.ER

ET = Erro total  
ES = Erro sistemático ou inexactidão  
ER = Erro randômico ou imprecisão  
z = fator relativo ao nível de confiança desejado (z = 1,65 para 90% de confiança e z = 1,96 para 95% de confiança)

Portanto, ao se considerar z = 1,65 (geralmente, utiliza-se este valor para este tipo de avaliação),



será obtido um  $ET = 3,3 + 1,65.2 = 6,6\%$ . A título de interpretação, esse valor extrapola o limite de erro total permitido, 4,1%, que consta na literatura para hemoglobina. Ou seja, quando se soma o erro sistemático e o randômico, no caso da dosagem de hemoglobina, o resultado não deve ultrapassar 4,1%, conforme recomendações estabelecidas por entidades reconhecidas.

Quando se ultrapassa o erro total permitido, deve-se analisar qual tipo de erro exerceu mais influência para que isso ocorresse. No caso da hemoglobina, o erro sistemático máximo permitido é 1,8%, enquanto o coeficiente de variação máximo permitido para o teste é 1,4%. Conclui-se, nesse exemplo, que ambos os erros foram relevantes para que o resultado final ficasse acima do erro total permitido. A conduta correta do laboratório deveria ser verificar falhas no analisador que indicassem tanto erro sistemático (calibração, validade de reagentes, obstrução da tubulação etc.), como erro randômico (problemas hidráulicos, de pressão, vácuo, homogeneização da amostra, etc.). Também deve ser verificado se os técnicos que operam os equipamentos estão seguindo os procedimentos operacionais padrão e as boas práticas de laboratório, haja vista o erro total representar a qualidade do trabalho laboratorial em um contexto muito amplo, que vai além dos problemas técnicos do equipamento.

### CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

Laboratórios de análises clínicas utilizam ferramentas estatísticas para controle interno de qualidade desde 1950, quando Levey e Jennings adaptaram um modelo de controle de qualidade industrial proposto por Walter Shewhart para os laboratórios clínicos.<sup>11</sup>

Um bom controle de qualidade interno deve ser sempre orientado para os bons cuidados com os pacientes, assegurando qualidade em cada passo, desde o momento em que o paciente chega ao laboratório, até o momento de se reportar o resultado do exame. Portanto, um bom controle interno depende de fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. Os fatores pré-analíticos são discutidos separadamente no Capítulo 1, Fase pré-analítica em hematologia laboratorial. Um protocolo adequado de controle interno deve focar em manutenção da exatidão e precisão, detecção de erros randômicos e sistemáticos e em sua imediata correção antes que os resultados sejam reportados.

Em relação à fase analítica, deve-se considerar as recomendações que serão descritas, não esquecendo que o pré-analítico bem feito é o principal requisito para manter um bom desempenho no controle de qualidade analítico.

Ademais, o processo de controle de qualidade interno deve assegurar que os resultados dos pacientes sejam válidos e possam ser usados com segurança pelos médicos nas tomadas de decisões diagnósticas e terapêuticas. Também deve confirmar que o desempenho de um analisador hematólogo seja estável e sem oscilações ao longo do tempo. O controle de qualidade genericamente se refere aos métodos que garantem a confiabilidade analítica e estes, em geral, englobam uma grande variedade de procedimentos. Entre as abordagens mais utilizadas no laboratório de hematologia, estão incluídas a utilização de controles comerciais, de amostras retidas de pacientes e a verificação da consistência das médias móveis dos pacientes. Com os resultados dos materiais de controle, são gerados gráficos ou tabelas para monitoramento do desempenho analítico. Outra forma de avaliar a qualidade interna é por meio do *Delta Check*, em que são comparados os resultados de testes atuais com os resultados anteriores.

## CONTROLE DOS PASSOS ANALÍTICOS

### Reagentes e manutenções preventivas

Os reagentes utilizados nos equipamentos hematólogos devem ser obtidos do próprio fabricante do equipamento ou, em última instância, de fabricantes alternativos que sejam expressamente recomendados pelo fabricante original. Os reativos devem ser consumidos antes da expiração da data de validade, ser identificados com a data de recebimento, abertura e validade, seguidas as recomendações relativas ao armazenamento e consumo o estoque de modo que os reativos mais antigos sejam consumidos primeiro.

Um programa de manutenções preventivas, com base nas recomendações do fabricante, é essencial para uma operação contínua e confiável de todos os equipamentos. Tais manutenções devem ser rigorosamente seguidas e periodicamente revisadas quanto a sua efetividade, com base na experiência de cada laboratório.

### Calibração inicial

A calibração inicial de analisadores hematólogos deve sempre ser feita com calibrador e não



com amostras de controle comercial e muito menos com as de pacientes. Apesar de serem amostras com matrizes semelhantes, diferem nos intervalos de variação aceitáveis. Os calibradores possuem ranges mais estreitos que os controles comerciais e, por isso, devem ser utilizados inicialmente quando se instala um analisador. Os calibradores também devem ser utilizados após manutenções que alterem mecanismos de diluição ou troca de abertura, em mudanças de ambiente físico ou conforme recomendação do manual e, periodicamente, quando aconselhado pela assistência técnica. As boas práticas de laboratório recomendam sempre exigir um laudo de calibração do fornecedor para fins de registro, acreditação e participação do laboratório em protocolos de pesquisa.

### Verificação da calibração com a utilização de controles comerciais

Os controles comerciais são amostras de sangue enviadas periodicamente pelo fabricante do equipamento, com valores médios e desvios permitidos definidos em bula para vários parâmetros hematológicos. Em hematologia, em geral, são fornecidos em três níveis com concentrações baixas, normais e altas. Os controles comerciais são utilizados na verificação da integridade da calibração dos equipamentos, que deve ser periódica, pelo menos uma vez ao dia, a fim de mensurar a precisão e exatidão dos analisadores. A utilização de controles comerciais também pode ser definida como um teste de reprodutibilidade interdias.

Quando valores para os parâmetros hematológicos são obtidos a partir de uma amostra de controle de qualidade comercial, uma série de perguntas pode ser feita sobre o valor e a sua relação com os valores médios observados. Esse processo de questionamento é chamado de análise de Westgard e tem o intuito de verificar o valor do controle em relação à violação de uma série de instruções chamadas regras de controle de Westgard. Essas regras se aplicam a limites de desempenho específicos e auxiliam na detecção de erros para não reportar resultados errados e nem executar repetições desnecessárias dos controles comerciais, que custam caro. Na **Tabela 4.2**, são mostradas regras de controle de qualidade e condutas a serem seguidas para as amostras de controles comerciais.<sup>11-13</sup> Essas regras, entre várias, são sugeridas especificamente para analisadores hematológicos e funcionam de forma apropriada na detecção

dos problemas relativos ao controle interno de qualidade. De um modo geral, devemos escolher as regras de controle que tenham maiores chances de detectar um erro e menor probabilidade de indicar uma falsa rejeição das corridas, pois, com isso, economiza-se tempo e dinheiro.

As ações a serem tomadas quando as regras são violadas dependem da causa do erro (sistemático ou randômico). O **Quadro 4.4** mostra possíveis causas de erros nas análises de analisadores hematológicos.

### ■ SUGESTÕES PARA O CONTROLE INTERNO COM CONTROLES COMERCIAIS

Em geral, os valores de bula dos controles comerciais possuem ranges muito amplos para os parâmetros hematológicos, não refletindo as variações esperadas e, normalmente, observadas nos analisadores hematológicos. Recomenda-se utilizar médias obtidas especificamente para o analisador hematológico em questão. Portanto, quando se muda um lote de controle comercial, cada laboratório deve gerar pelo menos 10 análises de cada nível para gerar as médias. As novas médias devem se encontrar dentro das faixas esperadas que estão na bula do lote. Juntamente com as novas médias, calcula-se o desvio-padrão, e é este desvio-padrão que deve ser utilizado para interpretar as regras de controle. A nova média e o novo desvio-padrão refletem melhor o desempenho analítico do equipamento e melhoram a percepção de erros randômicos e sistemáticos quando presentes. Cabe frisar que os resultados das análises do novo lote do controle comercial devem ser coletados quando ainda se está utilizando o lote mais antigo, de modo que a transição entre lotes de controle seja mais segura.

Todos os resultados das análises, as ocorrências e as ações tomadas devem estar registrados em planilhas de computador ou planilhas impressas para fins de monitoramento, rastreamento e fiscalização (vigilância sanitária).

A confiabilidade que se deposita nos resultados reportados por determinado laboratório significa que a exatidão e a precisão adequadas estão combinadas nos resultados dos exames. Para manter essa máxima, recomenda-se que os calibradores e os controles comerciais sejam da mesma marca do equipamento e da mesma fonte do material a ser analisado, isto é, sangue total fresco e humano.



**TABELA 4.2** Regras de controle de qualidade recomendadas para controles comerciais em analisadores hematológicos

REGRA	DEFINIÇÃO	COMENTÁRIOS E AÇÕES
1 <sub>2s</sub>	Usar como aviso de alerta quando 1 observação do controle exceder o limite de $x \pm 2DP$	Passar novamente a amostra. Se 1 resultado estiver fora do mesmo limite, dentro dos últimos 20 pontos, ou se a repassagem obtiver valores fora do mesmo limite, deve-se rejeitar a corrida. Verificar ocorrência de erro sistemático, fazer manutenção corretiva e, caso necessário, recalibração do analisador
2 <sub>2s</sub>	Rejeitar a corrida quando 2 determinações consecutivas do controle estiverem do mesmo lado da média e excederem o limite de $x + 2DP$ ou $x - 2DP$	Detectar desvios (erro sistemático). Se confirmado, fazer recalibração do analisador
(2 de 3) <sub>2s</sub>	Rejeitar uma corrida quando 2 de 3 medições do controle excederem o mesmo limite de $x \pm 2DP$	Detecta erros sistemáticos.
1 <sub>3s</sub>	Rejeitar uma corrida quando uma observação do controle exceder $x \pm 3DP$	Detecta erros randômicos e sistemáticos, e a corrida deve ser rejeitada até resolução do problema.
1 <sub>3,5s</sub>	Rejeitar uma corrida quando uma observação do controle exceder o limite de $x \pm 3,5DP$	Passar novamente a amostra. Se a repassagem obtiver valores fora do mesmo limite, deve-se rejeitar a corrida. Verificar ocorrência de erro sistemático ou randômico, fazer manutenção corretiva e, caso necessário, chamar assistência técnica para calibração do analisador
1 <sub>4s</sub>	Rejeitar uma corrida quando uma observação do controle exceder o limite de $x \pm 4DP$	
1 <sub>4,5s</sub>	Rejeitar uma corrida quando uma observação do controle exceder o limite de $x \pm 4,5DP$	
R <sub>4s</sub>	Rejeitar uma corrida quando a amplitude (range) entre duas medições consecutivas entre duas corridas exceder 4 DP	Indica erro randômico, e a causa deve ser investigada e resolvida para que a rotina possa ser liberada
3 <sub>1s</sub>	Rejeitar uma corrida quando 3 medições consecutivas do controle excederem o mesmo limite $x \pm 1DP$	Indica erro sistemático entre corridas em um mesmo nível ou entre controles em uma mesma corrida

Estatisticamente, é aceito se observar 1 ponto entre 2 e 3DP a cada 20 análises do controle (alerta) e 1 ponto acima de 3DP a cada 100 análises (ação). Entenda-se  $x \pm DP$  como média  $\pm$  desvio-padrão.

**Fonte:** Adaptada de Camarinha e colaboradores<sup>2</sup> e Cembrowski e colaboradores.<sup>12</sup>

**QUADRO 4.4** Potenciais causas de erros randômicos e sistemáticos na análise de controles hematológicos comerciais

ERRO RANDÔMICO	ERRO SISTEMÁTICO
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Bolhas de ar na amostra resultando em pouca aspiração</li><li>▪ Bolhas de ar na tubulação do analisador resultando em pouca aspiração</li><li>▪ Bolhas de ar nos reativos resultando em pouca aspiração</li><li>▪ Controle analisado logo após ser retirado da geladeira, sem chegar à temperatura ambiente</li><li>▪ Homogeneização inadequada do controle</li><li>▪ Ruído na rede elétrica</li><li>▪ Erro do operador na inserção da amostra controle no modo aberto, resultando em pouca aspiração</li><li>▪ Problemas hidráulicos e de pressão no analisador</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Calibração</li><li>▪ Mudança no lote de algum reagente</li><li>▪ Deterioração de reagentes</li><li>▪ Deterioração dos controles</li><li>▪ Entupimento parcial da tubulação do analisador</li><li>▪ Problemas na lâmpada do espectrofotômetro do analisador</li><li>▪ Homogeneização inadequada do controle</li><li>▪ Quantidade da amostra controle não é suficiente para que seja feita a aspiração pelo analisador</li></ul>

Em hematologia, é sensato considerar o uso de 3 níveis de controle de uma só vez, tendo em vista que 3 diferentes níveis de controle são, normalmente, analisados pelo menos uma vez ao dia: baixo, normal e alto. Portanto, no caso específico da

hematologia, sugere-se utilizar combinações de regras de controle, chamadas de multirregras de Westgard, para parâmetros hematológicos que possuam determinação direta como a hemoglobina (espectrofotometria), VCM e a contagem de



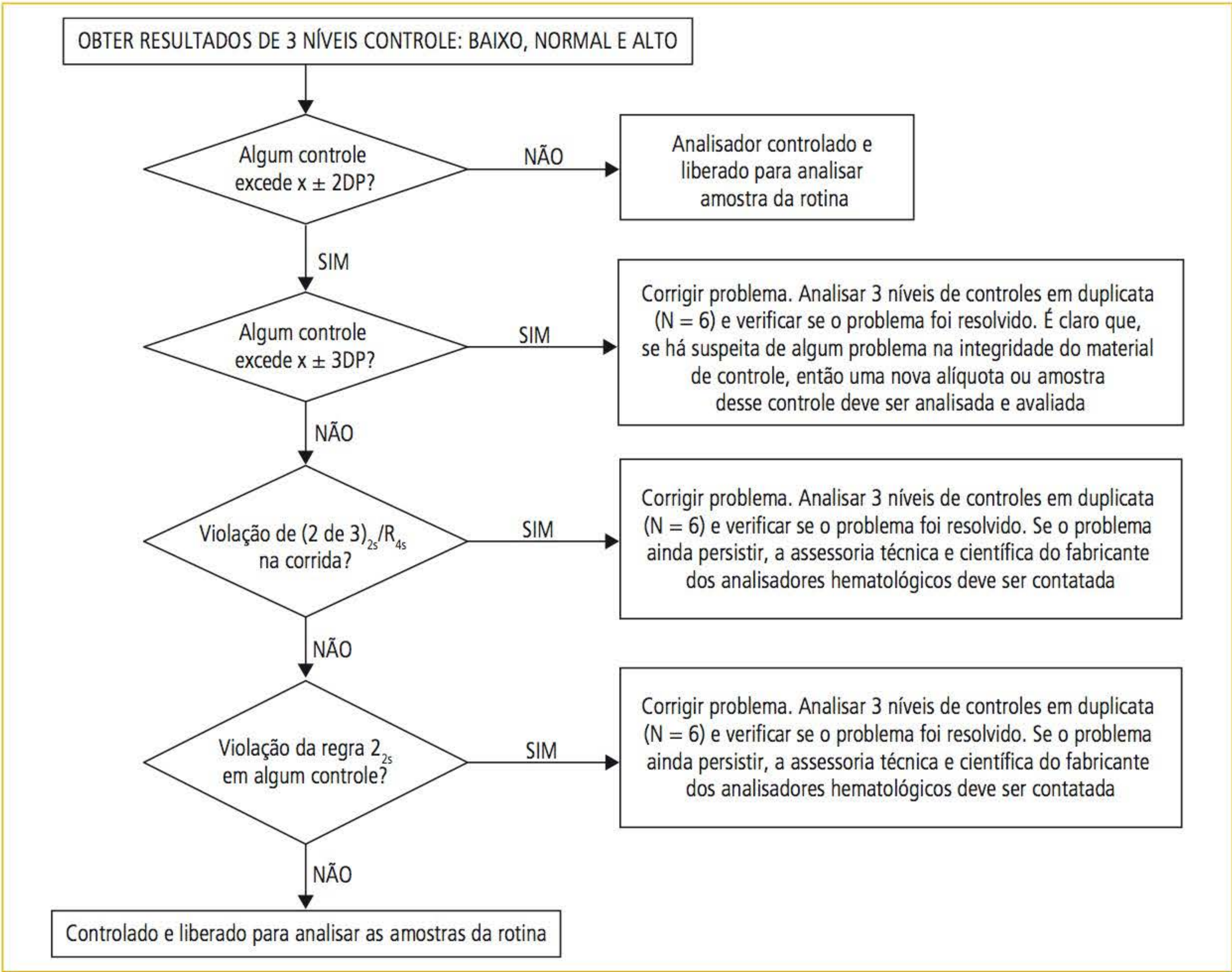
eritrócitos, leucócitos e plaquetas (impedância ou dispersão da luz). A combinação das regras  $1_{3s}/(2 \text{ de } 3)_{2s}/R_{4s}$  proporciona mais sensibilidade para detectar erros randômicos e sistemáticos sem que haja aumento significativo na probabilidade de falsa rejeição (fica em torno de 2% para 3 níveis de controle). Cabe enfatizar que as regras ideais para se utilizar são aquelas que geram elevada probabilidade de detecção de erro e baixa probabilidade de falsa rejeição de uma corrida. A **Figura 4.2** mostra as orientações para a implantação da multirregra  $1_{3s}/(2 \text{ de } 3)_{2s}/R_{4s}$ .

Os parâmetros calculados como RDW, HCM e CHCM podem ser devidamente controlados

com regras simples como  $1_{3s}$ , a qual tem uma baixa probabilidade de falsa rejeição, ou seja, ser positiva e não haver desvio analítico relevante.

■ MÉDIAS MÓVEIS DOS PACIENTES

O programa X-B, ou XbarM, ou, ainda, média móvel de Bull, desenvolvido por Brian Bull e instalado em vários analisadores hematológicos, avalia as médias dos resultados dos parâmetros hematológicos nas amostras dos pacientes. A fórmula compara cada resultado de um determinado parâmetro em relação a um lote de médias de outros pacientes e usa uma função integrada para aparar os dados, a fim de minimizar o peso



**FIGURA 4.2** Implantação do procedimento de controle multirregas  $1_{3s}/(2 \text{ de } 3)_{2s}/R_{4s}$ .

**Obs.:** Quando a regra  $(2 \text{ de } 3)_{2s}$  é utilizada com  $N = 3$  por corrida, como mostrado na figura,  $(2 \text{ de } 3)_{2s}$  é violada quando um teste excede o limite da média  $\pm 2DP$  em 2 ou mais níveis de controle na mesma corrida ou entre corridas. O tipo de erro deve ser determinado (randômico ou sistemático) e o processo analítico investigado. Se um teste exceder a média  $\pm 2DP$  em somente 1 nível de controle, o resultado prévio da corrida anterior desse material deve ser investigado para verificar se ocorreu uma violação da regra  $2_{2s}$ . Caso afirmativo, o tipo de erro deve ser determinado (randômico ou sistemático) e o processo analítico investigado. Quando a regra  $R_{4s}$  é utilizada com  $N = 3$  por corrida, como mostrado na figura,  $R_{4s}$  é violada sempre que o intervalo entre quaisquer 2 níveis de controle, dentro da mesma corrida, exceder  $4s$ .  $N$ , número de níveis de controle utilizados por corrida. **Fonte:** Adaptada de Cembrowski e Carey.<sup>15</sup>



de um único resultado caindo muito longe da média. Um novo lote de médias de cada parâmetro é calculado para cada 20 ou mais amostras, conforme o tamanho da rotina do laboratório. As médias geradas para cada parâmetro hematológico são razões entre várias médias e, como tal, são muito estáveis, além de possuírem uma faixa de referência estreita na população.<sup>14</sup>

O controle X-B é utilizado para monitorar a estabilidade do analisador hematológico ao longo do tempo, detectando erros sistemáticos entre as análises. O controle X-B é afetado por variações nos resultados dentro de uma mesma corrida e, se um limite for extrapolado, os resultados das amostras devem ser avaliados. Dessa forma, **é um bom método para acompanhar periodicamente, de hora em hora, mudanças nos resultados**, devido a problemas com o analisador hematológico (fator de diluição, calibração, etc.) e com os reagentes (trocas).

No caso de baterias com muitos pacientes renais crônicos e em quimioterapia, grandes variações dos parâmetros podem ser observadas, e isso deve ser levado em conta na interpretação dos resultados. O controle X-B tem como base o fato de que uma vez que as características da população sejam estabelecidas para uma instituição, os parâmetros permanecerão estáveis dentro desses limites. Para determinar os valores alvos das médias dos parâmetros, os seguintes passos devem ser realizados:

- 1. Analisar 1,2 mil amostras de sangue ou 1 semana de trabalho. Aconselha-se evitar pacientes da hemato/oncologia.
- 2. Calcular a média, desvio-padrão e coeficiente de variação para cada parâmetro hematológico por meio de *software* do analisador hematológico.
- 3. O CV% em torno das médias deverá ser menor que as sugestões descritas nas **Tabelas 4.3 e 4.4**.
- 4. Os valores utilizados nestes cálculos devem ser fisiologicamente possíveis.

Há três principais razões para as médias móveis ficarem fora do range permitido:

- 1. População não randômica;
- 2. Problemas no analisador hematológico ou nos reagentes;
- 3. Calibração.

Bull observou que os índices eritrocitários (VCM, HCM e CHCM) variam menos que os de-

**TABELA 4.3** Limites aceitáveis para a variação das médias móveis para a série vermelha

SÉRIE VERMELHA	LIMITES EM RELAÇÃO À MÉDIA
Eritrócitos	5%
Hemoglobina	
Volume globular	
VCM	3%
HCM	
CHCM	
RDW-SD	5%
RDW-CV	

**TABELA 4.4** Limites aceitáveis para a variação das médias móveis para a série branca e plaquetas

SÉRIE BRANCA E PLAQUETAS	LIMITES EM RELAÇÃO À MÉDIA
Leucócitos	10%
Neutrófilos % e #	
Linfócitos % e #	
Monócitos % e #	
Eosinófilos % e #	20%
Basófilos % e #	
Plaquetas	15%

mais parâmetros, e que os limites alvo desses índices estabelecidos para cada laboratório ao redor do mundo mostram apenas ligeiras variações. Esse fato fez com que tais índices se tornassem amplamente utilizados para monitorar os resultados gerados pelos analisadores hematológicos. A avaliação das médias móveis funciona muito bem para laboratórios que atendem, em sua maioria, pacientes ambulatoriais; contudo, demonstra numerosas situações de falsos positivos em laboratórios que atendem múltiplas especialidades clínicas, especialmente unidades de quimioterapia, queimados e pediatria.<sup>16</sup>

A maior vantagem da utilização das médias móveis é o seu baixo custo e sua estabilidade, assumindo que a média dos pacientes não deve mudar a longo prazo. Já a maior desvantagem é que esse método detecta apenas os erros sistemáticos e não os randômicos.

Mais recentemente, o programa X-B de média móvel foi expandido para os demais parâmetros,



como plaquetas e leucócitos. Contudo, devido ao fato de esses parâmetros possuírem maior variação na população, pode ocorrer diminuição do poder estatístico para detectar mudanças reais nas determinações.

De um modo geral, as médias móveis têm sido amplamente aceitas e utilizadas como um processo de controle de qualidade adicional para monitorar contagens automatizadas e identificar rapidamente os erros de determinado sistema.<sup>17</sup>

A **Tabela 4.5** mostra a inter-relação entre hemoglobina, a contagem de eritrócitos e o hematócrito na interpretação das médias móveis dos pacientes.

TABELA 4.5Índices eritrocitários: a relação entre hemoglobina, contagem de eritrócitos e o hematócrito

PARÂMETRO	EFEITO SOBRE OS ÍNDICES ERITROCITÁRIOS		
	VCM	HCM	CHCM
Hemoglobina ↓	Sem mudança	↓	↓
Hemoglobina ↑	Sem mudança	↑	↑
Eritrócitos ↓	↑	↑	Sem mudança
Eritrócitos ↑	↓	↓	Sem mudança
Hematócrito ↓	↓	Sem mudança	↑
Hematócrito ↑	↑	Sem mudança	↓

↑, aumenta; ↓, diminui.

Com base na **Tabela 4.5**, analise a **Figura 4.3** e responda qual é o parâmetro que deve ser ajustado.

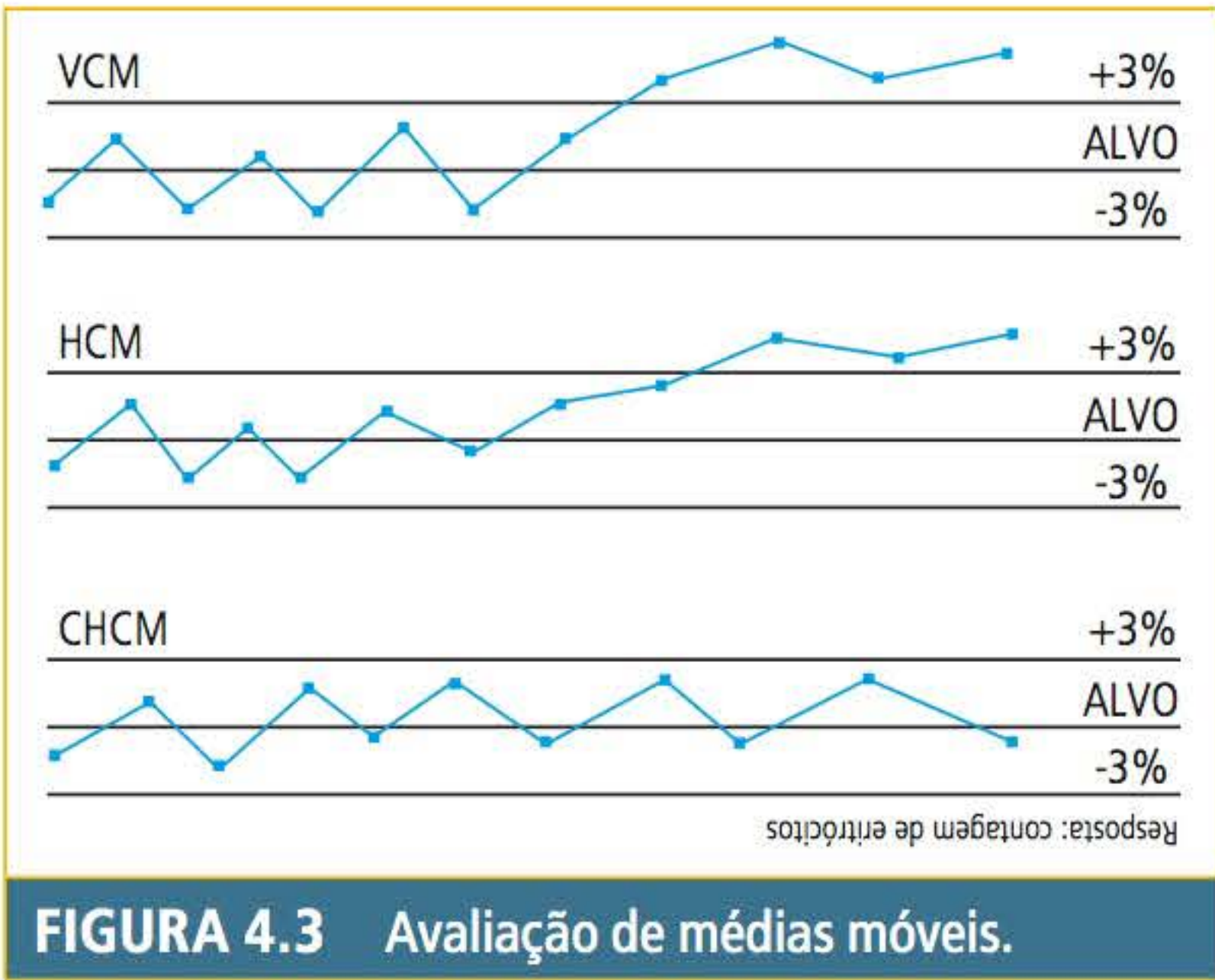


FIGURA 4.3 Avaliação de médias móveis.

AMOSTRAS RETIDAS DE PACIENTES

A utilização de amostras retidas de pacientes da rotina é barata e pode servir para detectar tendên-

cias e mudanças no curto prazo (de um dia para o outro). Apesar dos controles de qualidade comerciais serem considerados mais sensíveis para a detecção de erros de análise, eles são caros e podem apresentar instabilidade ao longo do tempo. Por isso, o uso de amostras retidas e médias móveis é uma boa alternativa para complementar o controle interno de qualidade.<sup>12</sup>

Vários métodos têm sido propostos para definir limites analíticos para imprecisão e inexatidão em analisadores hematológicos. Uma boa opção é utilizar limites analíticos considerando componentes da variabilidade biológica pelo fato de existir, para os parâmetros do hemograma, literaturas específicas com tais limites. Para verificação dos resultados fornecidos por um único analisador ao longo do dia (intraequipamento), o desempenho desejável varia de 25 a 50% da variação biológica. Ou seja, podemos definir  $CVa < 0,50 \times CVi$ , o que significa que a imprecisão máxima permitida (CVa) deve ser menor que 50% da variabilidade biológica intraindividual (CVi). Para dois ou mais analisadores hematológicos em um mesmo laboratório, sugere-se utilizar a seguinte especificação de qualidade:  $CVa < 0,75 \times CVi$ , que significa que a imprecisão máxima permitida (CVa) deve ser menor que 75% da variabilidade biológica intraindividual (CVi).<sup>18</sup>

Normalmente, quando se verifica a reprodutibilidade intraequipamento, o desempenho desejável varia de 25 a 50% da variação biológica. Entretanto, quando se pretende comparar resultados entre dois analisadores distintos, o limite aceitável de variação deve ser maior, sobretudo por serem sistemas analíticos independentes e pela necessidade de se considerar a existência de pequenas diferenças nos valores alvo dos controles comerciais para cada equipamento, quando estes são de fabricantes ou modelos diferentes, o que implica pequenas diferenças na exatidão.

A **Tabela 4.6** mostra uma sugestão de limites a serem seguidos para o controle diário da reprodutibilidade intra e interequipamentos. Primeiramente, deve-se escolher uma amostra fresca e com os resultados dentro da normalidade e analisá-la uma vez a cada 50 ou 100 amostras em cada analisador ao longo do dia. É importante frisar que as amostras devem ser analisadas no mínimo 3 vezes em cada equipamento ao longo do dia. Na avaliação intraequipamento, os módulos aberto e fechado devem ser analisados e, para isso, calcula-se o



TABELA 4.6 Controle de qualidade interno: variação máxima permitida intra e interanalísadores hematológicos

PARÂMETROS	CVi	INTRA-ANALISADOR	INTERANALISADOR
		REGRA: $CVa \leq 0,50 \times CVi$ (%)	REGRA: $CVa \leq 0,75 \times CVi$ (%)
Eritrócitos	3,2	1,6	2,4
Hemoglobina	2,8	1,4	2,1
Volume Globular	2,8	1,4	2,1
Plaquetas	9,1	4,5	6,8
VCM	1,3	0,7	1,0
HCM	1,6	0,8	1,2
CHCM	1,7	0,9	1,3
RDW-CV	3,5	1,7	2,6
RDW-SD	3,5	1,7	2,6
Leucócitos	10,9	5,5	8,2
Neutrófilos	16,1	8,0	12,1
Linfócitos	10,4	5,2	7,8
Monócitos	17,8	8,9	13,4
Eosinófilos	21	10,5	15,8
Basófilos	28	14	21
VPM	4,3	2,2	3,2
Reticulócitos	11,1	5,5	8,3

Fonte: Comar.<sup>18</sup>

coeficiente de variação para cada parâmetro; então, compara-se com a especificação de qualidade desejada (Tabela 4.6). Na avaliação interequipamentos, calcula-se a média de cada parâmetro e, com as duas médias (uma de cada analisador), calcula-se o coeficiente de variação obtido entre os dois analisadores. Por fim, comparam-se os coeficientes de variação obtidos com as especificações determinadas para cada parâmetro hematológico. Ressalta-se que a interpretação dos resultados do controle intra e interequipamentos diário e o plano de ação a ser tomado devem levar em consideração tanto a avaliação dos resultados dos controles comerciais como das médias móveis.

Os resultados das médias móveis dos pacientes e, logicamente, do sangue controle comercial e das amostras retidas dos pacientes não devem ser julgados isoladamente, mas sim em conjunto e ao longo dos dias, de modo a fornecer melhores subsídios em relação ao momento de se fazer uma intervenção corretiva no analisador hematológico. Para se fazer tal intervenção, cada laboratório deve ter um conjunto de procedimentos operacionais padrão, desenvolvido especificamente para o

tipo de analisador hematológico empregado naquele momento, em virtude das peculiaridades que cada marca e tecnologia apresentam.

REGRA DE TRÊS OU REGRAS DE OURO NA HEMATOLOGIA

Em algumas circunstâncias, é possível verificar a exatidão da contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e o volume globular por meio de uma rápida inspeção visual dos valores. Para isso, comparam-se os resultados com ajuda das seguintes fórmulas:

Hemoglobina × 3 = Volume globular (± 3%)  
Eritrócitos × 3 = Hemoglobina  
Eritrócitos × 9 = Volume globular  
Volume globular + 6 = Dois primeiros dígitos da contagem de eritrócitos

Essas fórmulas somente são aplicadas para indivíduos com eritrócitos normocíticos e normocrômicos e com morfologia normal. Não funcionam em situações de microcitose, macrocitose e



hipocromia intensas. Quando se observa valores que não estão em conformidade com estas fórmulas, deve-se procurar mudanças nos índices eritrocitários (VCM, HCM e CHCM) e analisar a morfologia dos eritrócitos na lâmina. Se o analisador hematológico não estiver analisando corretamente as amostras, todos os resultados estarão consistentemente fora das faixas indicadas pelas fórmulas, indicando necessidade de intervenção. Cabe ressaltar que essas fórmulas devem ser estritamente utilizadas para controle interno e jamais devem ser utilizadas para gerar resultados que serão liberados no hemograma.<sup>19-21</sup>

**AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS INTEROBSERVADORES**

Periodicamente, os profissionais envolvidos na microscopia devem fazer a contagem diferencial e avaliação da série vermelha de uma mesma lâmina, e os resultados devem ser comparados e discutidos; caso haja discrepâncias significativas entre as contagens, o conceito deve ser rediscutido. Para que os profissionais passem a realizar contagens com resultados semelhantes (diferenças estatisticamente não significativas) e que a comparação de hemogramas feitos por diferentes profissionais possa ser realizada, recomenda-se, inicialmente, padronizar o modo de escolher a região ótima de leitura das lâminas (área de trabalho) e a forma de escrutinação das mesmas (horizontal ou vertical).<sup>22</sup> As definições morfológicas das células também devem ser discutidas e padronizadas. A **Tabela 4.7** mostra a variação permitida na contagem diferencial. Recomenda-se que a concordância geral entre as contagens seja > 90% e que a concordância de tipos celulares específicos seja > 80%. A concordância é calculada estabelecendo-se o percentual de observadores que tiveram suas contagens dentro dos limites estabelecidos na **Tabela 4.6**. Para amostras normais, pode-se considerar a contagem automatizada como o método de referência, pois a automação conta milhares de células. Para tipos celulares anormais, deve-se considerar a média dos observadores ou a contagem do profissional mais experiente como a contagem de referência para as comparações.

**AUTOVERIFICAÇÃO DAS CONTAGENS (DELTA CHECK)**

*Delta check* é uma técnica de controle de qualidade de amostras clínicas na qual os resultados atuais

TABELA 4.7 Variação permitida na contagem diferencial interobservadores conforme o número de células contadas			
% CONTADA (MÉTODO DE REFERÊNCIA)	100 CÉLULAS	200 CÉLULAS	500 CÉLULAS
0	0-3	0-2	0-0,7
1	0-5	0-4	0,3-2,3
2	0-6	0-6	1-3,6
3	0-8	1-6	1,7-4,9
4	1-9	2-7	2,5-6,1
5	2-10	3-7	3,3-7,3
6	2-13	3-11	4,1-8,5
7	2-14	3-12	4,9-9,6
8	3-16	4-13	5,8-10,7
9	4-17	5-14	6,6-11,9
10	4-18	6-16	7,5-13
15	8-24	10-21	12-18,4
20	12-28	14-27	16,6-23,8
25	16-35	19-32	21,3-29
30	21-39	23-37	26-34,2
35	25-46	28-43	30,8-39,4
40	30-50	33-48	35,7-44,4
45	35-56	37-53	40,6-49,5
50	40-60	42-58	45,5-54,5
60	50-70	53-67	55,6-64,3
70	61-79	63-77	65,8-74
75	65-84	68-81	71-78,7
80	72-88	74-86	76,2-83,4
90	84-96	86-94	87-92,5
100	96-100	98-100	99,3-100

Fonte: Adaptada de Cornbleet,<sup>23</sup> Houwen,<sup>24</sup> Pierre,<sup>25</sup> e Rümke.<sup>26</sup>

de um paciente são comparados com os seus resultados anteriores. Se as diferenças forem significativas, a nova amostra é sinalizada, indicando que há necessidade de examinar ou reanalisar a lâmina e as condições da amostra devido a um possível erro do analisador, do observador ou então pelo fato de a situação clínica do paciente ter se alterado. O *Delta check* funciona bem quando o laboratório dispõe de um bom sistema de informação que permita inserir os valores limites e sinalize os resultados alterados. Os erros mais co-



muns e graves detectados pelo *Delta check* são falhas na homogeneização da amostra, microcoágulos, que interferem em contagens sucessivas de plaquetas, e trocas de amostras. Na prática, são estabelecidos limites para os parâmetros hemato-lógicos, analisando se o resultado mais recente pode diferir do resultado anterior. Para que o *Delta check* seja válido, o resultado anterior deve ter sido liberado dentro do período de até 5 dias ante-riores ao resultado atual. A **Tabela 4.8** mostra su-gestões de critérios de autoverificação de resulta-dos (*Delta check*). Os critérios podem ser em valores relativos ou absolutos.

CONTROLE DE QUALIDADE DE PROCEDIMENTOS E PESSOAL

Os procedimentos operacionais padrão (POP) contêm as instruções e as informações específicas para todos os exames laboratoriais. Um POP bem feito é um bom guia de treinamento, especialmen-te para funcionários novos, e também serve como fonte de referência para exames que são realizados com menos frequência. O correto uso dos POPs reduz erros e assegura que pequenos procedimen-tos, por mais simples que possam ser, **não sejam deixados de lado**, mas sim considerados como procedimentos legítimos. Resumidamente, um POP deve conter o seguinte conteúdo: 1. Nome do teste, 2. Princípio, 3. Preparo do paciente, 4. Re-quisitos da amostra, 5. Equipamentos utilizados, 6. Preparo dos reagentes, 7. Procedimentos do tes-te, 8. Cálculos, 9. Procedimentos de controle de qualidade, 10. Valores de referência, 11. Valores críticos para alerta, 12. Limitações do procedi-mento, 13. Cronograma de manutenção, 14. Refe-rências bibliográficas e 15. Assinatura e data de revisão.

Apesar dos POPs do laboratório de hematologia conterem todos esses elementos, uma **ênfase** maior deve ser direcionada para os seguintes detalhes:

- 1. A descrição de cada tipo celular encontrado no sangue e em outros fluidos biológicos deve ser claramente definida por escrito. Esta ação ajudará a reduzir diferenças inte-rindivíduos na identificação de células san-güíneas. O maior exemplo é a distinção en-tre bastonetes e segmentados ou entre linfócitos normais e atípicos. Problemas na identificação dessas células podem ser re-duzidos por meio de definições claras e con-cisas que sejam utilizadas por todos os pro-fissionais do laboratório de hematologia.

TABELA 4.8 Exemplos de critérios de autoverificação de resultados de parâmetros hematológicos (*Delta check*)

PARÂMETRO	INTERVALO	DELTA CHECK (%)	DELTA CHECK (ABSOLUTO)
Leucócitos	2,0 a 50,0 x 10 <sup>3</sup> /μL	50	10,0 x 10 <sup>3</sup> /μL
Eritrócitos	2,0 a 8,0 x 10 <sup>6</sup> /μL	50	1,5 x 10 <sup>6</sup> /μL
Hemoglobina	8,0 a 20,0 g/dL	30	4 g/dL
Volume globular	23 a 60%	12%	
VCM	50 a 110 fL	7	6 fL
HCM	Qualquer valor	10	-
CHCM	30 a 45%	-	3%
RDW-CV	Qualquer valor	-	2,5%
Plaquetas	20 a 1.000 x 10 <sup>3</sup> /μL	30	150 x 10 <sup>3</sup> /μL
VPM	Qualquer valor	-	2,5
Neutrófilos	Qualquer valor		
Bastões	≤ 30%	-	20
Monócitos	Qualquer valor	30	1,0 x 10 <sup>3</sup> /μL
Eosinófilos	≤ 20%	50	% ± 8
Linfócitos atípicos	10 a 20%	-	% ± 15
Linfócitos atípicos	≤ 10%	-	% ± 10
Metamielócitos	10 a 20%	-	% ± 20
Metamielócitos	≤ 10%	-	% ± 10
Mielócitos	5 a 20%	-	% ± 10
Mielócitos	≤ 5%	-	% ± 5
Promielócitos	3 a 10%	-	% ± 10
Promielócitos	≤ 3%	-	% ± 4
Blastos	10 a 20%	-	% ± 20
Blastos	5 a 10%	-	% ± 10
Blastos	≤ 5%	-	% ± 5
Eritroblasto/ 100 leucócitos	75 a 100%	-	% ± 50
Eritroblasto/ 100 leucócitos	50 a 75%	-	% ± 25
Eritroblasto/ 100 leucócitos	25 a 50%	-	% ± 20
Eritroblasto/ 100 leucócitos	≤ 25%	-	% ± 15

Fonte: Adaptada de Davis,<sup>27</sup> Davis,<sup>28</sup> Gulati e colaboradores<sup>29</sup> e Buttarello.<sup>30</sup>



2. A maneira de reportar os resultados da contagem diferencial de leucócitos e da análise microscópica deve estar claramente descrita e deve ser seguida por todos. Sugere-se eliminar o uso indiscriminado de termos genéricos, como anisocitose e poiquilocitose, sendo mais específico na descrição do tamanho e das formas eritrocitárias. Quando se quantifica as alterações em cruzes (1+, 2+, 3+), deve-se estabelecer o que realmente significa cada uma dessas graduações.
3. Os critérios de revisão de lâminas devem ser definidos em POP e deve ser compreendido por todos os profissionais, que devem saber exatamente por que estão revisando determinada lâmina.
4. Entre os POPs, deve estar incluído um item sobre os procedimentos de calibração dos analisadores hematológicos. Este procedimento ajuda a assegurar consistência na calibração, uma vez que os profissionais dos vários turnos de trabalho podem enfrentar dificuldades com o desempenho analítico dos analisadores.
5. Os POPs de controle de qualidade, com limites de tolerância e ações a serem tomadas quando os limites são ultrapassados também devem estar disponíveis. Muitos cuidados devem ser tomados na manipulação de controles comerciais e na seleção e preparo de amostras de pacientes que serão usadas como controle interno.
6. O bom senso dita que um POP, não importa quão bem redigido esteja, é inútil quando os profissionais que devem seguir suas instruções não estão confiantes e seguros sobre seu conteúdo. Portanto, a necessidade de sempre estar treinando e reciclando o pessoal do laboratório nunca deve ser subestimada.<sup>20,21</sup>

### CONTROLE DE QUALIDADE EXTERNO

Todos os laboratórios devem participar de um programa de avaliação externa da qualidade para verificar o seu desempenho perante outros laboratórios em relação a um material que é fornecido especialmente para tal fim. Em geral, é organizado como um programa de ensaios de proficiência em uma base regional, nacional ou internacional, cujos participantes são os laboratórios dos respectivos países. A análise do desempenho é retrospectiva, e

o objetivo é conseguir comparabilidade interlaboratorial e verificar quais são os melhores métodos para serem utilizados na rotina. No Brasil, existem dois programas de controle de qualidade externo, o PNCQ, da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, e o ControlLab, em parceria com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Existem ensaios de proficiência específicos para a hematologia, como é o caso do *Insight*<sup>TM</sup> da Sysmex® e o Interlab Quality Control (ILQC) da Siemens®. A vantagem deles é que são considerados de centenas a milhares de analisadores hematológicos espalhados pelos continentes para que as análises sejam feitas, trazendo bons subsídios para as interpretações dos resultados para cada modelo de analisador hematológico.

O controle externo é pré-requisito para creditações laboratoriais. É uma exigência junto aos principais planos de saúde e são obrigatórios, segundo portarias e resoluções mais recentes, como a RDC 302/2005 e a MS1353/2011.<sup>31,32</sup>

O controle externo deve estar sempre aliado ao controle interno e a uma gestão comprometida com a qualidade, de modo a promover melhorias dos processos analíticos e garantia de resultados mais confiáveis.

### IMPACTO DO CONTROLE DE QUALIDADE NOS RESULTADOS DOS EXAMES E NAS CONDUTAS MÉDICAS

É de fundamental importância que se tenha uma boa compreensão dos fatores que podem ter impacto sobre os resultados dos exames, sobretudo pela enorme ênfase que é dada aos valores numéricos alcançados. Os resultados obtidos quando as amostras são analisadas não são valores indiscutivelmente perfeitos. Normalmente, esses valores estão um pouco distantes dos valores verdadeiros (erro sistemático) e oscilam ao redor do mesmo (erro randômico). A influência destes dois tipos de erros é chamada de variação analítica. Os resultados ainda são influenciados pela variação pré-analítica (discutida no Capítulo 1, Fase pré-analítica em hematologia laboratorial) e pela variação biológica individual do parâmetro analisado.

A variação pré-analítica é muito difícil de ser mensurada; por isso, se for padronizada, pode-se minimizar e, até mesmo, eliminar a variação dos resultados decorrentes de fontes pré-analíticas, fazendo com que a variação dos resultados dependa mais exclusivamente das variáveis analíticas e biológicas. Para entendimento da variação bioló-



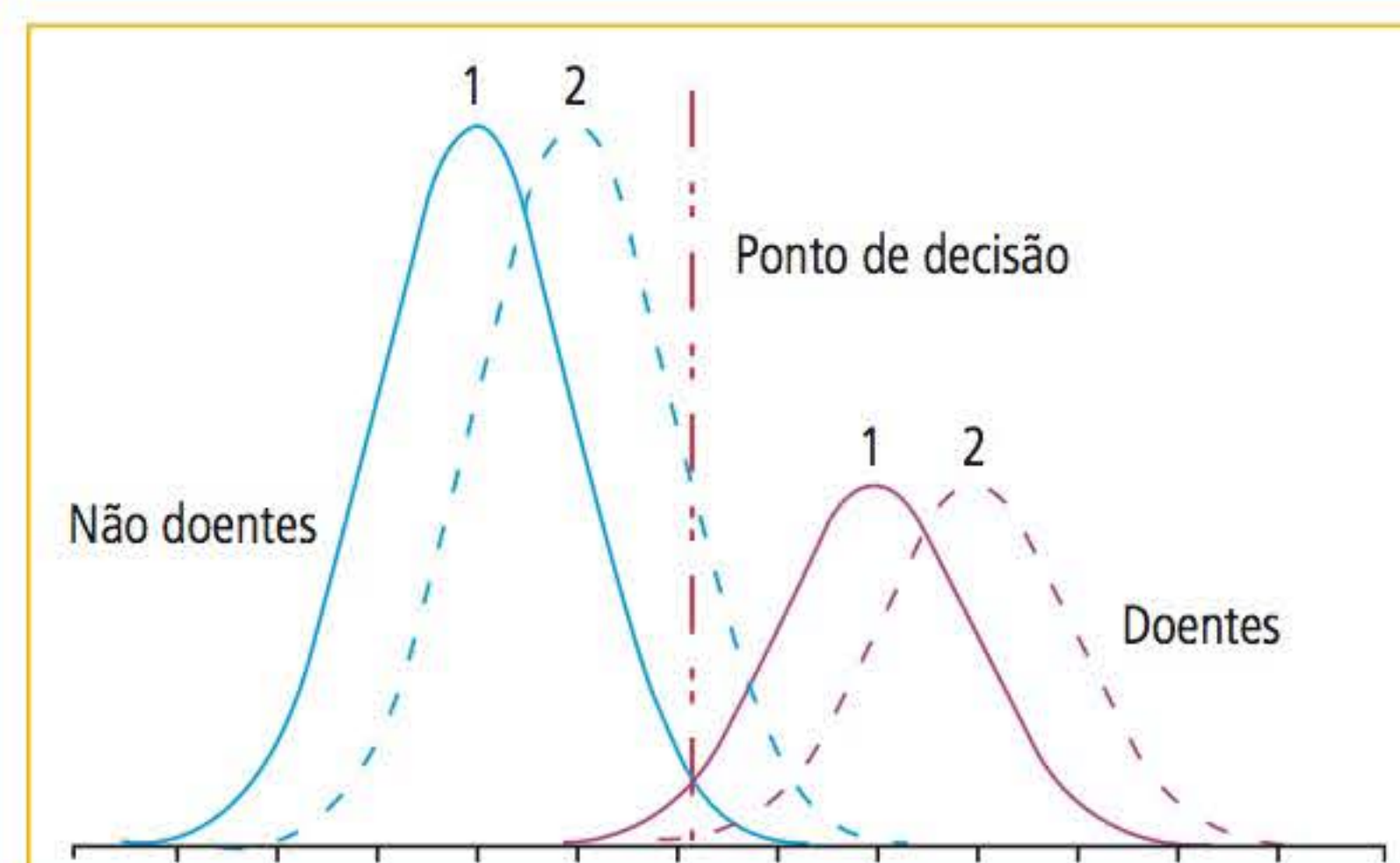
gica, deve-se ter em mente que a maioria dos resultados dos analitos flutua em torno de um ponto homeostático nos indivíduos, dando origem à variação biológica intraindivíduo ou CVi. Essa variação biológica intraindivíduo é aleatória, e o ponto homeostático difere entre indivíduos, dando origem à variação biológica de um grupo de indivíduos ou interindivíduos (CVg).

Da mesma forma que o CV analítico provoca incerteza em torno de um resultado de laboratório, o CVi provoca incerteza em torno da concentração de um analito em um indivíduo ao longo do tempo. Por exemplo, o CVi para plaquetas é de 9,1%, ou seja, a obtenção de um resultado de 150.000/ $\mu$ L em um indivíduo implica que a sua contagem de plaquetas, em determinado momento, possa ser entre 136.350 e 163.650/ $\mu$ L, sem que haja uma verdadeira mudança na produção das plaquetas. Alguns analitos têm uma maior variação biológica do que outros, por exemplo, VCM de 1,3% e leucócitos 10,9%. Ao interpretar os resultados, tanto a variação analítica como a biológica devem ser levadas em conta.

Existem muitas aplicações para os dados de variação biológica. As mais importantes são o índice de individualidade (II), os valores de referência da mudança, os quais indicam se a diferença entre resultados consecutivos de um paciente é significativa ou não e, por fim, a definição de especificações de qualidade em laboratórios.

O índice de individualidade (II) é calculado da seguinte forma:  $CVi/CVg$ . O II compara a variação biológica intraindivíduo com a interindivíduos. Esse índice prediz a utilidade de um intervalo de referência. A maioria dos parâmetros hematológicos possui  $CVi < CVg$  (Tabela 4.9) e, quando essa regra é observada, diz-se que o parâmetro possui elevada individualidade e que os valores de um determinado indivíduo cobrem apenas uma pequena parte do intervalo de referência. Nesses casos, a utilização de valores de referência para sexo e idade são de baixa utilidade para prever mudanças significativas na evolução dos pacientes. Isso quer dizer que os pacientes podem ter valores que seriam anormais para eles, mas que ainda estariam dentro dos valores de referência convencionais. Portanto, a realização do hemograma objetivando diagnóstico precoce nunca terá 100% de sensibilidade, e casos falsos negativos são muito comuns.

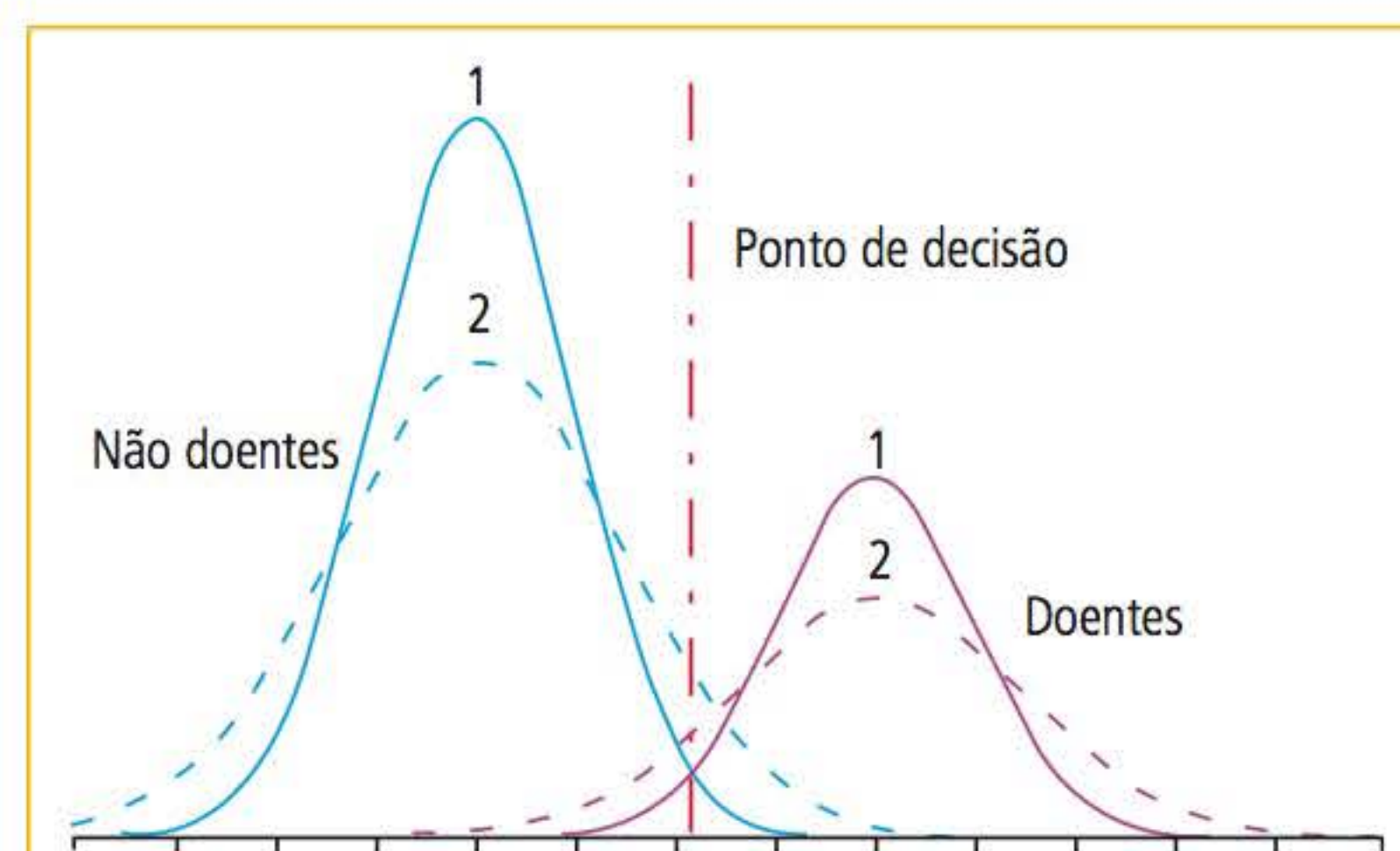
Em relação à variação analítica, se ela não for devidamente controlada pelo laboratório por meio de uso adequado de ferramentas da qualidade que diminuam a incidência de erros randômicos e sistemáticos, podem ocorrer mudanças nas condutas clínicas devido a mudanças espúrias nos valores de decisão clínica dos parâmetros hematológicos. A Figura 4.4 mostra o impacto de erros sistemáticos em pontos de decisão clínica.



**FIGURA 4.4** Simulação de erro sistemático nas determinações.

1, distribuições corretas; 2, distribuições nas quais um erro sistemático provocou um desvio analítico positivo (para a direita).

No exemplo da Figura 4.4, o erro sistemático observado provoca um aumento espúrio de indivíduos não doentes que passam a ser considerados como doentes (falsos positivos). Por outro lado, ocorre diminuição de indivíduos doentes que eram considerados como não doentes. No balanço final, percebe-se que muitas condutas médicas serão tomadas desnecessariamente à custa de uma pequena redução dos falsos negativos. A Figura 4.5 mostra o impacto de erros randômicos em pontos de decisão clínica.



**FIGURA 4.5** Simulação de erro randômico nas determinações.

1, distribuições corretas; 2, distribuições nas quais um erro randômico provocou um aumento da imprecisão em relação ao valor real de determinada análise.



No exemplo da **Figura 4.5**, o erro randômico observado provoca um aumento espúrio de indivíduos não doentes que passam a ser considerados como doentes (falsos positivos) e um aumento espúrio de indivíduos doentes que passam a ser considerados como não doentes. No balanço final, percebe-se que muitas condutas médicas serão tomadas desnecessariamente (falsos positivos) e que muitas não serão tomadas adequadamente (falsos negativos).

Por meio dessas abordagens, percebe-se que o controle de qualidade vai muito além da simples comparação diária dos valores obtidos para os parâmetros com os valores especificados nas bulas dos controles. Deve-se compreender o controle de qualidade em um contexto amplo, em que os resultados gerados provocam ações que terão impacto direto sobre os cuidados com os pacientes. Nesse sentido, o laboratório tem um papel fundamental e deve dedicar muito cuidado e atenção na utilização de ferramentas que monitorem adequadamente a qualidade dos resultados reportados.

### COMO SABER SE UM RESULTADO REALMENTE DIFERE DE OUTRO

Em geral, a análise de um resultado quantitativo baseia-se na sua comparação com valores de referência e pontos de corte de decisão clínica. Esse tipo de análise permite ao médico saber se o resultado está de acordo com os valores encontrados na maioria dos indivíduos normais. Contudo, os limites utilizados para definir a condição de normalidade são muito amplos, especialmente para os parâmetros hematológicos, que possuem elevado índice de individualidade, impedindo a detecção precoce de variações particulares em um mesmo indivíduo.

Como parte de um serviço de qualidade, os laboratórios de hematologia devem fornecer subsídios para ajudar os médicos a interpretar os números que são reportados. Isso pode ser feito por meio de guias objetivos sobre a significância das mudanças em resultados seriados, os quais podem auxiliar na avaliação da evolução dos tratamentos aplicados e na definição do estado do paciente (normalidade, recaída, processo de cura, etc.). Devem ser estabelecidos critérios que possibilitem definir se um par de resultados é igual entre si e com qual grau de certeza.

Para determinar se a disparidade entre dois resultados realmente representa uma diferença no estado do paciente, necessita-se identificar e me-

dir todas as fontes de variações (pré-analítica, analítica e biológica). Em virtude da dificuldade de medição da variação pré-analítica, em função das diversas variáveis associadas a ela, é de grande importância que ela seja levada a um nível insignificante pela padronização dos procedimentos de orientação e preparação do paciente, coleta, transporte, centrifugação, manuseio, etc.

A variação analítica, ou CVa, é medida pelo controle interno de qualidade e define qual a fração da variação de um resultado que está associada a oscilações do sistema analítico em uso.

A variação biológica individual para cada parâmetro hematológico deve ser tomada de literaturas confiáveis, de modo a parametrizar a variação possível que pode ser observada em um indivíduo saudável em uma condição de equilíbrio.

Além dessas medidas de variações, é necessário arbitrar o nível de significância que se deseja para a análise dos dados. É um consenso adotar o nível de significância de 5%, porém, eventualmente, é possível adotar 1%.

Fraser<sup>33</sup> sugere a adoção de uma fórmula que sintetiza as variáveis expostas anteriormente para a determinação da referência para diferença entre medições (RCV, do inglês *reference change value*), tomadas de um mesmo paciente em um dado intervalo de tempo. A fórmula é a seguinte:

$$RCV = Z \times (\sqrt[3]{2}) \times (\sqrt[3]{CVa^2 + CVi^2})$$

Z = coeficiente da distribuição normal e assume o valor 1,96 se o nível de significância for de 5% e 2,58 se o nível de significância for de 1%.

( $\sqrt[3]{2}$ ) = valor utilizado pelo fato de se compararem os resultados entre duas amostras

CVa = utiliza-se o coeficiente de variação analítica do controle interno de qualidade do laboratório

CVi = utiliza-se o coeficiente de variação biológica intraindivíduo das melhores fontes disponíveis

A precisão e a exatidão do analisador hematológico para determinado parâmetro exercem importante influência sobre o valor do RCV. Quanto menor a imprecisão, menor será o RCV.

Para demonstrar a utilização do RCV, utilizam-se os exemplos a seguir:

**1. Homem, 73 anos, tem a concentração de hemoglobina inicial de 10,3 g/dL. Ele inicia o uso de sulfato ferroso e, após 20 dias de tratamento, fez um novo exame para acompanhamento, e a hemoglobina obtida foi de 11,7 g/dL. A hemoglobina realmente subiu devido ao tratamento?**



**Resposta:**

Primeiro valor = 10,3 g/dL

Segundo valor = 11,7 g/dL

Diferença observada em relação ao valor inicial = 1,4 g/dL = 13,59%.

CVa = 0,8%

CVi = 2,8%

$\sqrt[3]{2} = 1,414$

Z = 1,96

**DIFERENÇA CRÍTICA:**

$$RCV = Z \times (\sqrt[3]{2}) \times (\sqrt[3]{CVa^2 + CVi^2})$$

$$RCV = 1,96 \times 1,414 \times (\sqrt[3]{0,8^2 + 2,8^2})$$

$$RCV = 8,07\%$$

A diferença de 13,59% entre as duas medidas é superior ao limite estabelecido de 8,07%, o que nos permite afirmar que os resultados são diferentes entre si, sendo o nível de significância de 5%.

**2. Mulher, 45 anos, obteve uma contagem inicial de plaquetas de 24.000/ $\mu$ L. Retornou ao médico hematologista, o qual sugeriu a realização de uma punção de medula óssea para mielograma e biópsia. Na dúvida sobre o resultado inicial e sobre a necessidade de indicar transfusão de plaquetas, o médico solicitou uma segunda contagem no mesmo laboratório, que foi de 18.000/ $\mu$ L. Sabe-se que, para indicar transfusão de plaquetas, sua contagem deve estar abaixo de 20.000/ $\mu$ L. Caso não fosse considerado apenas o gatilho de corte (20.000/ $\mu$ L), mas se houve ou não variação significativa entre os resultados das duas contagens, haveria a necessidade de se fazer uma transfusão profilática de plaquetas nesta paciente?**

**Resposta:**

Primeiro valor = 24.000/ $\mu$ L

Segundo valor = 18.000/ $\mu$ L

Diferença observada em relação ao valor inicial = 6.000/ $\mu$ L = 25%.

CVa = 4,6%

CVi = 9,1%

$\sqrt[3]{2} = 1,414$

Z = 1,96

**DIFERENÇA CRÍTICA:**

$$RCV = Z \times (\sqrt[3]{2}) \times (\sqrt[3]{CVa^2 + CVi^2})$$

$$RCV = 1,96 \times 1,414 \times (\sqrt[3]{4,6^2 + 9,1^2})$$

$$RCV = 28,26\%$$

A diferença de 25% entre as duas medidas é inferior ao limite estabelecido de 28,26%, o que

nos permite afirmar que os resultados são iguais entre si, com o nível de significância de 5%.

Talvez pela segurança da paciente, a transfusão profilática realmente devesse ser realizada. Por outro lado, o resultado mostrou que não houve diferença estatística entre as duas contagens, o que poderia ter simplificado a conduta médica, além de diminuir custos com procedimentos desnecessários. Outro fator que contribuiu para esse resultado foi o CVa de 4,6%, que está no limite de variação aceitável para a contagem de plaquetas. Quanto maior o valor CVa, maior será o RCV. Os laboratórios devem tentar sempre reduzir ao máximo a imprecisão e inexatidão dos resultados, de modo que pequenas variações possam indicar mudanças verdadeiras com elevado grau de confiança estatística.

### ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE EM HEMATOLOGIA

Antes de se implantarem práticas de controle de qualidade para melhorar a qualidade dos resultados e do laboratório, de um modo geral, deve-se saber exatamente aonde se quer chegar, ou seja, qual nível de qualidade é necessário para satisfazer as necessidades dos profissionais do laboratório, dos médicos e dos pacientes. Esse nível de desempenho recebe o nome de especificação da qualidade.

Nesse sentido, vários estudos têm proposto metas analíticas para imprecisão e inexatidão aceitáveis para os parâmetros hematológicos. Muitos autores utilizam limites de variação analítica, considerando componentes da variabilidade biológica pelo fato de existir, para os parâmetros do hemograma, literaturas específicas com tais limites. Desse modo, a imprecisão máxima sugerida para os parâmetros hematológicos deve ser menor que a metade da variabilidade biológica intraindividual ( $CV_{(analítico)} \text{ ou imprecisão} < 0,50 \times CV_{(intra)}$ ), enquanto a inexatidão deve ser menor que um quarto da variação biológica interindivíduos, que, por sua vez, é definida como o somatório da variação biológica intra e interindivíduo ( $Bias_{(analítico)} \text{ ou inexatidão} < 0,25 \times (CV_{(intra)}^2 + CV_{(inter)}^2)^{1/2}$ ). O somatório destas duas metas é utilizado para se calcular o erro total permitido ( $ETp < 0,250 \times (CV_{(intra)}^2 + CV_{(inter)}^2)^{1/2} + 1,65 \times (0,50 \times CV_{(intra)})$ ).<sup>34</sup> A **Tabela 4.9** mostra algumas especificações de qualidade para parâmetros hematológicos.



TABELA 4.9 Especificações de qualidade e informações adicionais para vários parâmetros hematológicos						
PARÂMETRO	CVi (%)	CVg (%)	CVa (%)	BIAS (%)	II	ETp (%)
Eritrócitos	3,2	6,1	1,6	1,7	0,52	4,4
Hemoglobina	2,8	6,6	1,4	1,8	0,42	4,1
Volume globular	2,8	6,4	1,4	1,7	0,43	4,1
VCM	1,3	4,8	0,7	1,2	0,27	2,3
HCM	1,6	5,2	0,8	1,4	0,30	2,7
CHCM	1,7	2,8	0,9	0,8	0,60	2,2
RDW-CV	3,5	5,7	1,8	1,7	0,61	4,6
RDW-SD	3,5	5,7	0,8	1,8	0,61	4,3
Leucócitos	10,9	19,6	5,5	5,6	0,55	14,6
Plaquetas	9,1	21,9	4,6	5,9	0,41	13,4
Neutrófilos	16,1	32,8	8,1	9,1	0,49	22,4
Linfócitos	10,4	27,8	5,2	7,4	0,37	16
Monócitos	17,8	49,8	8,9	13,2	0,35	27,9
Eosinófilos	21	76,4	10,5	19,8	0,27	37,1
Basófilos	28	54,8	14	15,4	0,51	38,5
Reticulócitos	11	33	5,5	7,8	0,33	16,8
VPM	4,3	8,1	2,2	2,3	0,53	5,8
PDW	2,8		1,4			
Plaquetócrito	11,9		6,0			
CHr	1,0	3,8	2,6		0,26	
IRF			10,9	19,4		52

CVi, variação biológica intraindivíduo; CVg, variação biológica interindivíduos; CVa, coeficiente de variação analítica máxima permitida; Bias, inexatidão máxima permitida; II, índice de individualidade (CVi/CVg); ETp, erro máximo permitido. CHr, conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos; IRF, fração de reticulócitos imaturos.

**Fonte:** Adaptada de Fraser,<sup>33</sup> Ricós e colaboradores,<sup>35</sup> Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular,<sup>36</sup> Federal Register<sup>37</sup> e American Association of Bioanalysts.<sup>38</sup>

CONSIDERAÇÕES SOBRE A FASE PÓS-ANALÍTICA

A avaliação pós-analítica do hemograma é totalmente dependente das fases pré e intra-analítica, especialmente por ter de responder à pergunta inicial do médico por meio da qualidade analítica alcançada, no contexto do quadro clínico do paciente. Todos os conhecimentos relativos às fases pré e intra-analítica devem ser aplicados de modo a garantir que a fase pós-analítica possa realmente acentuar as habilidades percebidas pelos médicos na interpretação das informações do laboratório.

Os procedimentos pós-analíticos realizados dentro do laboratório incluem a verificação dos resultados laboratoriais, liberação dos resultados

no sistema de informação do laboratório e a forma de apresentação dos resultados aos médicos. Nessa etapa, os problemas mais comuns são a validação errada, resultados atrasados, não reportados ou reportados de forma incorreta por causa de erros de entrada de dados e erros de transcrição. O sistema de interfaceamento do laboratório deve ser de boa qualidade e possibilitar a configuração de critérios para liberação direta dos resultados de exames dentro dos limites de triagem, de modo a diminuir o tempo de liberação dos resultados e, assim, disponibilizar a informação mais rapidamente para os médicos.

Outra fonte bem conhecida de problemas pós-analíticos é a variabilidade interlaboratorial e imprecisão dos intervalos de referência. Valores de referência bem estabelecidos são fundamentais



para a interpretação clínica dos resultados laboratoriais. O uso de intervalos de referência inadequados afeta a interpretação clínica dos resultados, levando a erros na tomada de decisões clínicas.

A produção e liberação de laudos laboratoriais são passos cruciais em procedimentos pós-analíticos, visto que os seus formatos, conteúdos e as formas de expressar os resultados podem afetar a interpretação e a utilização dos dados laboratoriais pelos médicos.<sup>39</sup>

Nos hemogramas, devem estar descritas as informações essenciais para a correta interpretação dos resultados, como, por exemplo, a marca do analisador hematológico utilizado pelo laboratório, a fim de possibilitar a interpretação de parâmetros do hemograma com base nos princípios analíticos. É importante descrever se foi ou não realizada a revisão microscópica da lâmina do hemograma pelo fato de os resultados estarem dentro dos limites de triagem definidos pelo laboratório. Essas informações auxiliam os médicos no sentido de alertá-los quanto à possível presença de alterações hematológicas que não são identificadas pela automação nos resultados liberados sem revisão da lâmina. A correta interpretação dessa observação fará com que médicos solicitem revisão microscópica em hemogramas subsequentes, caso haja suspeita de alguma doença em especial. A automação é fundamental nos dias de hoje; contudo, os profissionais do laboratório devem supervisionar e controlar esse processo, de modo a agregar uma qualidade geral maior nos resultados fornecidos.

## REFERÊNCIAS

1. Cembrowski GS. Thoughts on quality-control systems: a laboratorian's perspective. *Clin Chem*. 1997;43(5):886-92.
2. Camarinha GC, Medeiros Jr N, Lopes RM. Controle interno. In: Oliveira CA, Mendes ME. *Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática*. Rio de Janeiro: ControlLab; 2011. v. 2.
3. Moser K, Seelenbinder F, McFadden S, Adkins C, Goshay M, Davis F. Selecting a new analyzer for the hematology laboratory: the experience at OhioHealth hospitals. *Lab Hematol*. 2001;7:245-54.
4. Veillon DM, Curry S, Tubbs K, Kaltenbach J, Cotelingam JD. Decision dilemma: how we chose a new hematology analyzer. *Lab Hematol*. 2000;6(3):151-6.
5. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. *Hematologia laboratorial*. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.
6. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(1):104-16.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Validation, verification, and quality assurance of automated hematology analyzers. Approved standard. 2nd ed. Wayne: CLSI; 2010.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference leukocyte (WBC) differential count (Proportional) and evaluation of instrument methods. Approved standard. 2nd ed. Wayne: CLSI; 2007.
9. International Council for Standardization in Haematology Expert Panel in Cytometry. Guidelines for the evaluation of blood cell analyzers including those used for differential leukocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. *Clin Lab Haematol*. 1994;16(2):157-74.
10. Stamminger G, Auch D, Diem H, Sinha P. Performance of the XE-2100 leukocyte differential. *Clin Lab Haematol*. 2002;24(5):271-80.
11. Levey S, Jennings E. The use of control charts in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol*. 1950;20(11):1059-66.
12. Cembrowski GS, Smith B, Tung D. Rationale for using insensitive quality control rules for today's hematology analyzers. *Int J Lab Hematol*. 2010;32(6):606-15.
13. Westgard J, Barry P, Hunt M, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1981;27(3):493-501.
14. Cembrowski GS, Chandler E, Westgard J. Assessment of "average of normals" quality control procedures and guidelines for implementation. *Am J Clin Pathol*. 1984;81(4):492-9.
15. Cembrowski GS, Carey RN. Quality control in hematology. In: Cembrowski GS, Carey RN. *Laboratory quality management: QC  $\Rightarrow$  QA*. Chicago: ASCP; 1989.
16. Klee GG, Schryver P. Quality assurance for basic haematology cell counts. In: Rowan RM, van Assendelft OW, Preston E, editors. *Advanced laboratory methods in haematology*. New York: Arnold; 2002.
17. Bull BS, Elashoff RM, Heilbron DC, Couperus J. A study of various estimators for the derivation of quality control procedures from patient erythrocyte indices. *Am J Clin Pathol*. 1974;61(4):473-81.
18. Comar SR. Quando se trabalha com mais de um equipamento é importante que as calibrações estejam semelhantes? Como se realiza esta verificação? In: Martinho MSC. *Hematologia em laboratório clínico*. São Paulo: Sarvier; 2012.
19. Riedinger TM, Rodak BF. Quantitative laboratory evaluation of erythrocytes. In: Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA, editors. *Clinical hematology: principles, procedures, correlations*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 1998.
20. Gulati GL, Hyun BH. Quality control in hematology. *Clin Lab Med*. 1986;6(4):675-88.
21. Stewart CE, Koepke JA. Hematology quality assurance. In: Stewart CE, Koepke JA. *Basic quality assurance practices for clinical laboratories*. Philadelphia: JB Lippincott; 1987.
22. Arderiu XF, Panyella MG, Bach DD. Between-examiner reproducibility in manual differential leukocyte counting. *Accred Qual Assur*. 2007;12(12):643-5.
23. Cornbleet PJ. Clinical utility of the band count. *Clin Lab Med*. 2002;22(1):101-36.
24. Houwen B. The differential cell count. *Lab Hematol*. 2001;7(2):89-100.
25. Pierre RV. Peripheral blood film review: the demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med*. 2002;22(1):279-97.
26. Rüemke CL. Variability of results in differential cell counts on blood smears. *Triangle*. 1960;4:154-7.



27. Davis GM. Autoverification of the peripheral blood count. *Lab Med*. 1994;25:528-31a.
28. Davis GM. A ruled-based system for cost savings in hematology. *MLO Med Lab Obs*. 1994;26(9):44-6b.
29. Gulati GL, Alomari M, Kocher W, Schwarting R. Criteria for blood smear review. *Lab Med*. 2002;5(33):374-7.
30. Buttarello M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. *Clin Chim Acta*. 2004;346(1):45-54.
31. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução n. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos. Brasília: ANVISA; 2005.
32. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria n. 1.353, de 13 de junho de 2011. Aprova o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Brasília: ANVISA; 2011.
33. Fraser CG. Changes in serial results. In: Fraser CG. *Biological variation: from principles to practice*. Washington: AACC; 2001.
34. Fraser CG. Quality specifications. In: Fraser CG. *Biological variation: from principles to practice*. Washington: AACC; 2001.
35. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(7):491-500.
36. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular [Internet]. Barcelona: SEQC; 2015 [capturado em 24 abr 2015]. Disponível em: <http://www.seqc.es/>.
37. Federal Register. Medicare, medicaid and CLIA programs: regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA), final rule. *Fed Regist*. 1992;57(40):7002-186.
38. American Association of Bioanalysts [Internet]. St. Louis: AAB; 2015 [capturado em 24 abr 2015]. Disponível em: <http://www.aab.org/aab/default.asp>.
39. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(6):750-9.



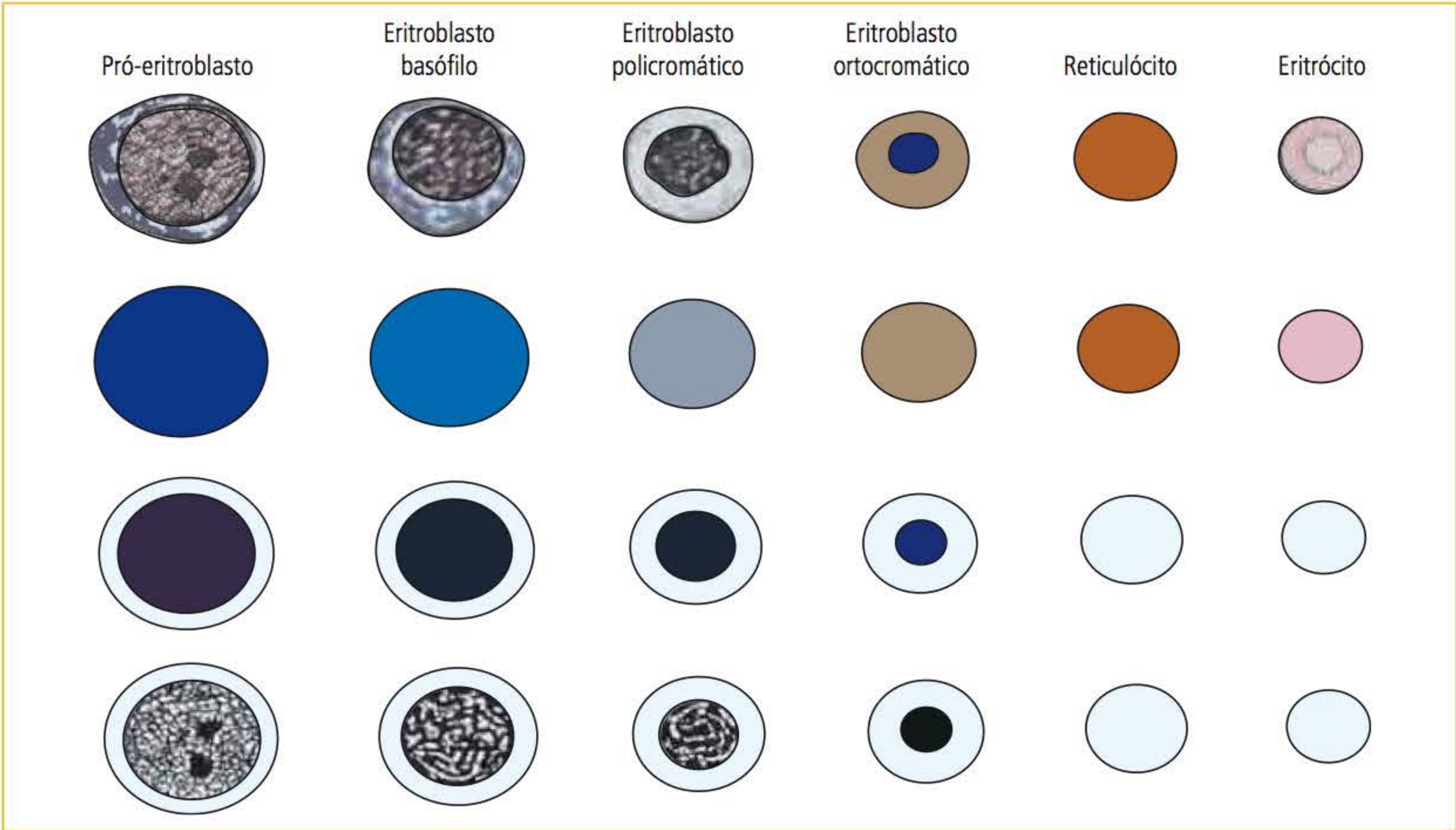


#### ERITROPOIESE

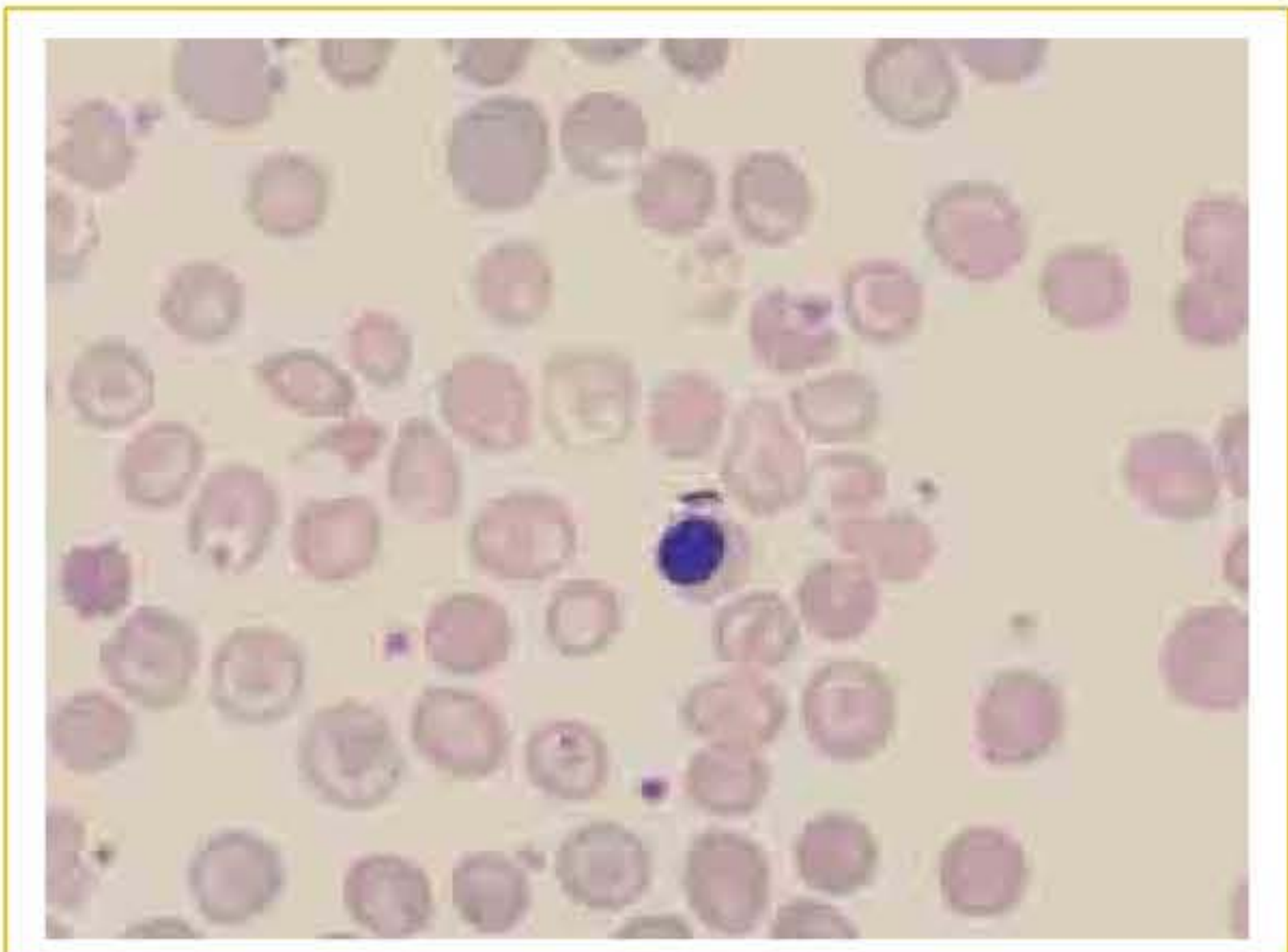
A célula-tronco hematopoiética pode se comprometer com a linhagem linfóide ou mieloide. Quando comprometida com a linhagem mieloide, a primeira célula formada é a CFU-GEMM (unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e macrófagos). A partir da CFU-GEMM, forma-se a primeira célula da linhagem eritroide, a BFU-E (do inglês *burst-forming unit-erythroid*). A palavra *burst* significa explosão, e a célula recebeu este nome pelo fato de que quando cultivada *in vitro*, ela gera de centenas a milhares de colônias entre 10 e 14 dias,<sup>1</sup> enquanto *in vivo* é a célula que mantém a eritropoiese. Esta célula necessita, para a proliferação e a diferenciação, de interleucina-3, fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos e eritropoietina (EPO). A BFU-E dá origem à CFU-E (do inglês *colony-forming unit-erythroid*), dependente de EPO para proliferação e a diferenciação e que origina a primeira célula reconhecível da série vermelha na medula óssea: o pró-eritroblasto (PERTB). O termo eritroblasto foi utilizado por Erlich para designar todas as formas de células vermelhas nucleadas, patológicas ou não.<sup>2</sup> O PERTB pode ser descrito como uma célula de tamanho que varia entre médio e grande, com um núcleo arredondado que ocupa 80% do citoplasma. A cromatina distribui-se homogeneamente em pequenos grumos, apresentando um padrão de cromatina condensada, se comparada ao mieloblasto ou linfoblasto, com nucléolos evidentes e com citoplasma que apresenta basofilia intensa. A quantidade de hemoglobina presente no PERTB é pequena.<sup>3</sup> O PERTB divide-se e dá origem ao eritroblasto basófilo (ERTBB), uma célula bastante semelhante ao PERTB, com a diferença que o ERTBB é menor, o nucléolo não é mais visto, a cromatina é mais condensada e a quantidade de hemoglobina aumenta. O PERTB, por divisão mitótica, origina o eritroblasto policromatófilo (ERTBP), que recebe este nome pela característica do citoplasma. Se o núcleo for retirado, o citoplasma é de um eritrócito com policromatofilia. O núcleo do ERTBP é pequeno; a cromatina é bastante condensada e heterogênea. O ERTBP divide-se e forma o eritroblasto ortocromático (ERTBO), que apresenta o citoplasma igual ao de um eritrócito, com grande quantidade de hemoglobina; o núcleo é picnótico e será expulso da célula. O ERTBO não se divide. Ele matura para a fase de reticulócito (RT), que é uma célula anucleada que difere do eritrócito por ser maior, em torno de 20%,<sup>4</sup> e que contém o RNA ribossomal. A forma final da eritropoiese é o eritrócito, uma célula bicôncava, anucleada e cheia de hemoglobina, mas incapaz de sintetizá-la. A **Figura 5.1** mostra a sequência de maturação da eritropoiese.

Conhecer a maturação eritroide facilita o entendimento de algumas situações práticas que acontecem diariamente no laboratório clínico. A **Figura 5.2** ilustra alterações morfológicas que são compatíveis com estado hemolítico. Os eritroblastos circulantes, a policromatofilia (reticulócitos) e os esferócitos presentes na imagem exemplificam a maioria dos estágios de maturação eritroide, o





**FIGURA 5.1** Sequência de maturação da eritropoiese. Aspectos morfológicos do citoplasma e do núcleo das células vermelhas durante seu processo de maturação.



**FIGURA 5.2** Aspectos morfológicos de estado hemolítico.

que representa um desequilíbrio na maturação celular.

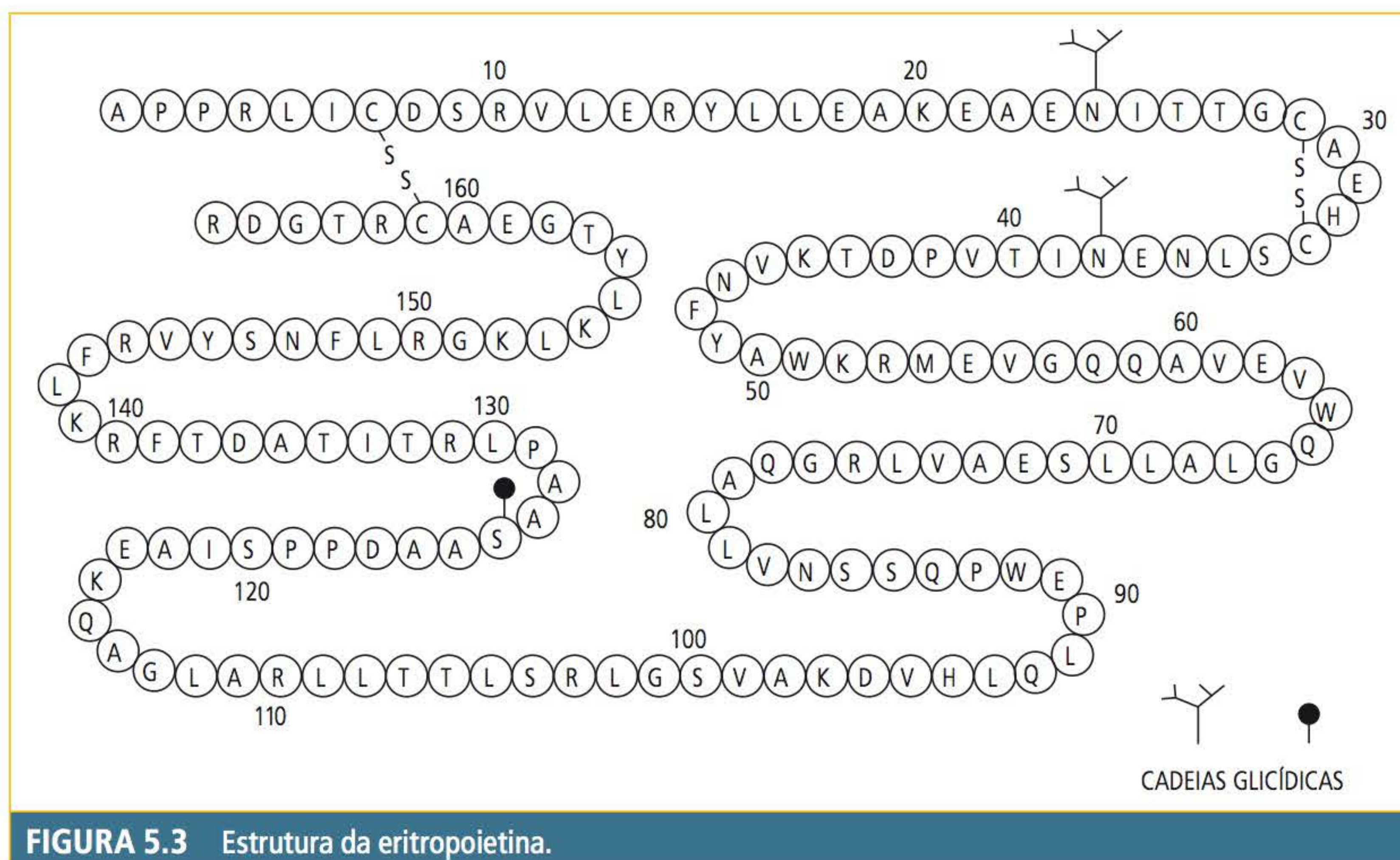
**ERITROPOIETINA**

Para que a eritropoiese se desenvolva, é necessário que ocorra a proliferação e a diferenciação dos precursores eritrocitários. A primeira função tem o sentido de formar a massa eritrocitária do corpo humano (eritron) e a segunda de formar uma célula totalmente diferenciada, repleta de hemoglobina e capaz de fazer a oxigenação dos tecidos. Para que essa atividade medular ocorra, há neces-

sidade de que se regulem as duas funções feitas pelos fatores de crescimento elaboradas por uma variedade de células no microambiente da medula óssea. O único fator de crescimento extramedular é a eritropoietina (EPO), principal responsável pela eritropoiese.<sup>5</sup> Se a EPO não estiver presente, os demais fatores não sustentam a eritropoiese. Isso pode ser observado em pacientes renais crônicos, os quais, devido à insuficiência renal, não produzem EPO. A anemia nestes pacientes é caracterizada como normocítica, normocrômica, sem pecilocitose significativa e instalando-se por falta de estímulo. Se um paciente renal crônico receber EPO, voltará a produzir eritrócitos. A EPO é um hormônio polipeptídico, glicoproteína, de cadeia única, com 165 aminoácidos e contém duas pontes de dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis<sup>7-161</sup> e Cis<sup>29-33</sup>),<sup>6</sup> cujo gene está localizado no cromossomo número 7.<sup>5</sup> A representação esquemática da estrutura polipeptídica da EPO está na **Figura 5.3**.

Cerca de 90% da eritropoietina é produzida no rim e 10% no tecido hepático.<sup>5</sup> A EPO é secreta pelas células tubulares ou células endoteliais peritubulares do rim, que têm sequências sensíveis à concentração de oxigênio e estão envolvidas com a regulação e expressão do gene.<sup>7</sup> Quando essas células entram em hipóxia, geram um sinal





**FIGURA 5.3** Estrutura da eritropoietina.

de transdução com consequente produção de EPO; porém, quando as células saem da hipóxia, ela para de ser produzida, o que comprova que a EPO, é secretada por estímulo da hipóxia. Todas as células comprometidas com a série vermelha apresentam receptores para a EPO, com exceção dos reticulócitos e eritrócitos,<sup>2</sup> e, na ausência de EPO, a célula entra em apoptose.<sup>8</sup> A EPO tem como funções estimular a proliferação de precursores medulares, aumentando assim o número de mitoses, estimular a diferenciação dos precursores, encurtando o tempo de maturação, estimular a síntese de hemoglobina e aumentar o número de reticulócitos no sangue.<sup>5</sup> Em anemias hemolíticas, o nível de EPO está aumentado devido à hipóxia tecidual. A hipóxia instala-se porque a produção não consegue suprir a destruição eritrocitária.

## FERRO

O ferro é absorvido no trato gastrointestinal, principalmente no duodeno,<sup>1</sup> e o pH estomacal é importante na absorção do ferro.<sup>2</sup> O pH do suco gástrico estabiliza o ferro da dieta e previne a sua precipitação como hidróxido férrico insolúvel.<sup>9</sup> Pacientes com acloridria ou gastrectomizados não fazem absorção do ferro e podem desenvolver anemia ferropriva. O ferro pode ser absorvido na forma de heme ou na forma livre como íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Todo ferro da dieta deve estar em uma das

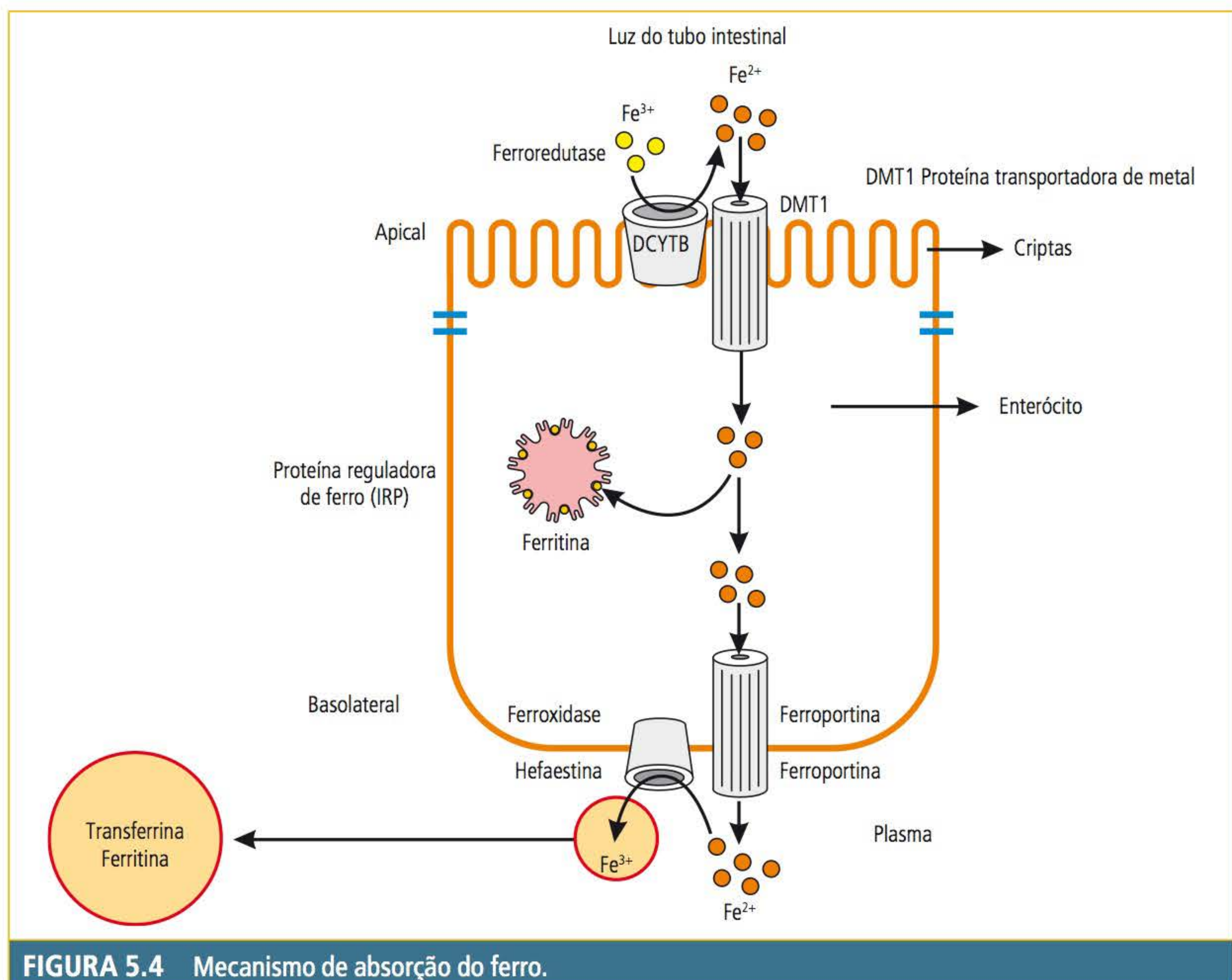
duas formas para ser absorvido.<sup>2</sup> A superfície apical do enterócito expressa uma proteína transportadora de metal divalente (DMT1), que absorve o ferro somente na forma ferrosa. Todo ferro não heme que chega ao enterócito na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por uma enzima ferroredutase citocromo *b-like*<sup>10</sup> para, posteriormente, ser transportado pela DMT1. O ferro na forma de heme é absorvido e no enterócito é degradado pela hemoxygenase. O ferro livre segue o mesmo caminho que o ferro não heme absorvido. Uma pequena parcela de ferro na forma de heme passa para o plasma e liga-se à hemopexina.<sup>11</sup> A ferroportina é uma proteína que se expressa na porção basolateral do enterócito e que transforma o ferro para o plasma na forma ferrosa; porém, para que o ferro possa ligar-se à transferrina (TRF), ele deve ser oxidado pela hefaestina para ficar na sua forma férrica. A transferrina é uma glicoproteína sintetizada pelo cromossomo 3, tendo como principal sítio de produção o fígado.<sup>12</sup> A transferrina transporta o ferro para os eritroblastos, os quais têm receptores para ela, para que o ferro seja utilizado na síntese de hemoglobina. Em situações fisiológicas, um terço da transferrina está ligada ao átomo de ferro, e os dois terços restantes que não estão ligados com o átomo de ferro são chamados de capacidade de transporte (ou de ligação) do ferro. A



relação em porcentagem de quanto de ferro está ligado à transferrina (um terço em situações fisiológicas) é chamado de índice de saturação.<sup>5</sup> O ferro pode ser dosado pela concentração plasmática (ferro ligado à transferrina), pela capacidade de transporte (quantidade da molécula da transferrina que não está ligada ao ferro) e pelo índice de saturação (concentração de ferro sérico em porcentagem). Quando o ferro sérico está baixo (pouca quantidade de ferro ligado à transferrina, menor que um terço), a capacidade está elevada e o índice de saturação baixo. Quando o ferro sérico está elevado (muita quantidade de ferro ligado à transferrina, mais que um terço), a capacidade está diminuída e o índice de saturação aumentado.

O ferro que se liga à ferritina (FIT) intracelular não é absorvido, mas perdido quando ocorre a morte do enterócito<sup>2</sup> (tempo de meia-vida entre 3 a 4 dias<sup>30</sup>), e essa perda é um mecanismo de regulação da absorção do ferro. O ferro pode ligar-se à ferritina plasmática para ser armazenado, e esta ligação se dá quando o ferro está na forma  $\text{Fe}^{2+}$ ;

após ser internalizado na molécula da ferritina ele é oxidado. A ferritina é uma proteína esférica constituída pelas subunidades H (cadeia pesada) e L (cadeia leve), sintetizada pelo cromossomo 19 em várias isoformas, cada uma com a característica de um determinado tecido (cardíaco, placenta, renal, hepático e baço).<sup>2</sup> A ferritina é produzida quando há oferta de ferro e, por este motivo, a concentração plasmática de ferritina correlaciona-se com os estoques de ferro.<sup>18</sup> O ferro não é estocado na forma de ferritina, mas como hemossiderina, que parece ser formado por uma degradação incompleta da ferritina com concentrados de ferro e outros constituintes e difere da ferritina por ter alta concentração de ferro.<sup>2</sup> Em 2001, foi descrito um hormônio, de produção hepática, com 20 a 25 aminoácidos que está correlacionado com os mecanismos de absorção intestinal do ferro que foi chamado de epcidina (*hepcidin*). Em animais, a perda da expressão da epcidina resulta em sobrecarga de ferro. A **Figura 5.4** exemplifica o mecanismo de absorção do ferro.<sup>13,14</sup>

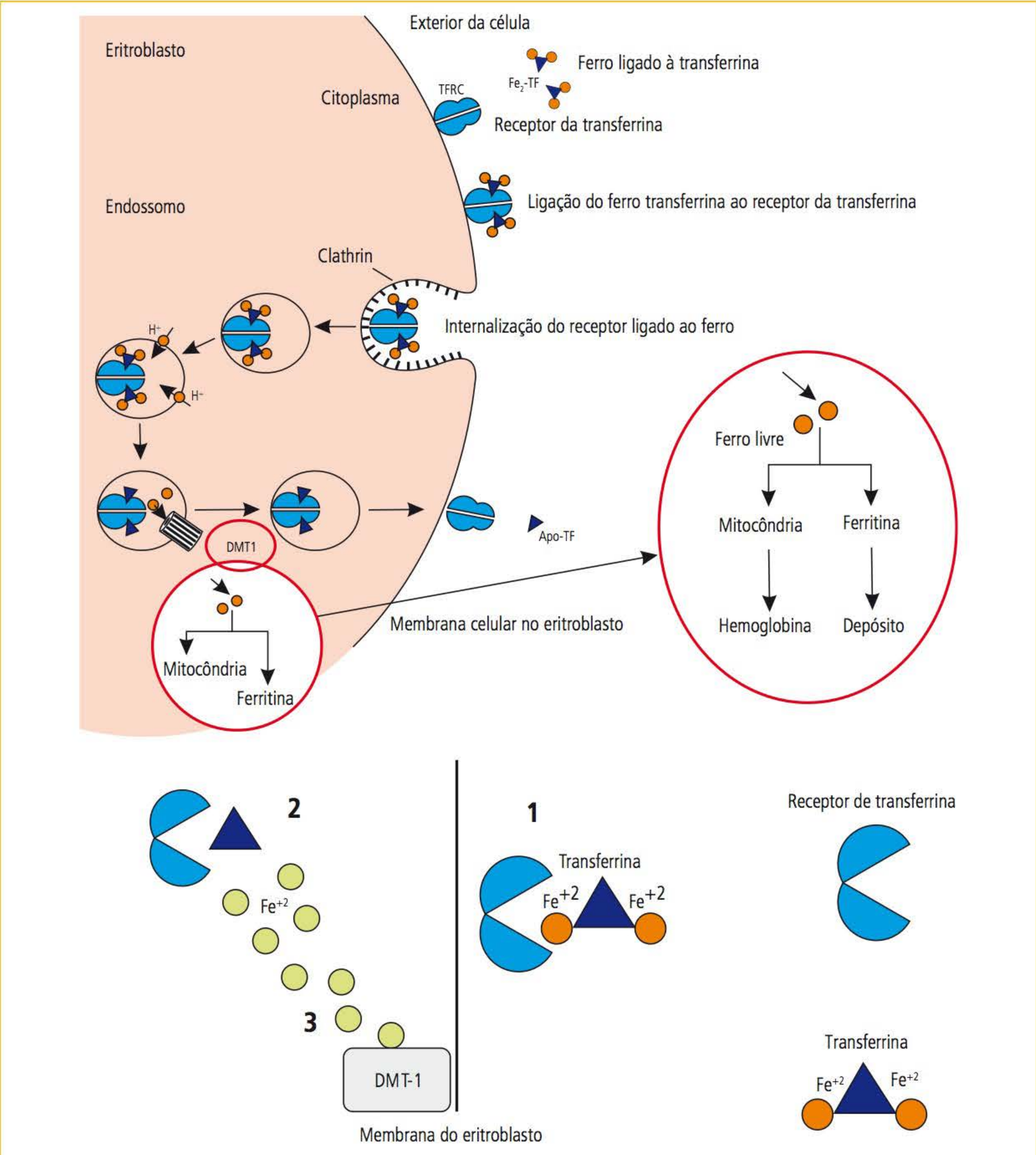


**FIGURA 5.4** Mecanismo de absorção do ferro.



O ferro, uma vez no plasma, pode se ligar à ferritina ( $\text{Fe}^{++}$ ) e ir para os depósitos de ferro no organismo (medula óssea e fígado) ou ligar-se à transferrina ( $\text{Fe}^{+++}$ ) e, então, ser transportado aos eritroblastos para ser utilizado na síntese de hemoglobina. Os eritroblastos expressam, na membrana citoplasmática, receptores para o complexo

TRF-Fe; a TRF liga-se ao receptor, e o complexo é internalizado por endocitose; o endossomo é acidificado; e o ferro liberado do complexo, que pode ser incorporado ao heme, na mitocôndria, pela enzima ferroquelatase. A **Figura 5.5** mostra o mecanismo de internalização do ferro nos eritroblastos.



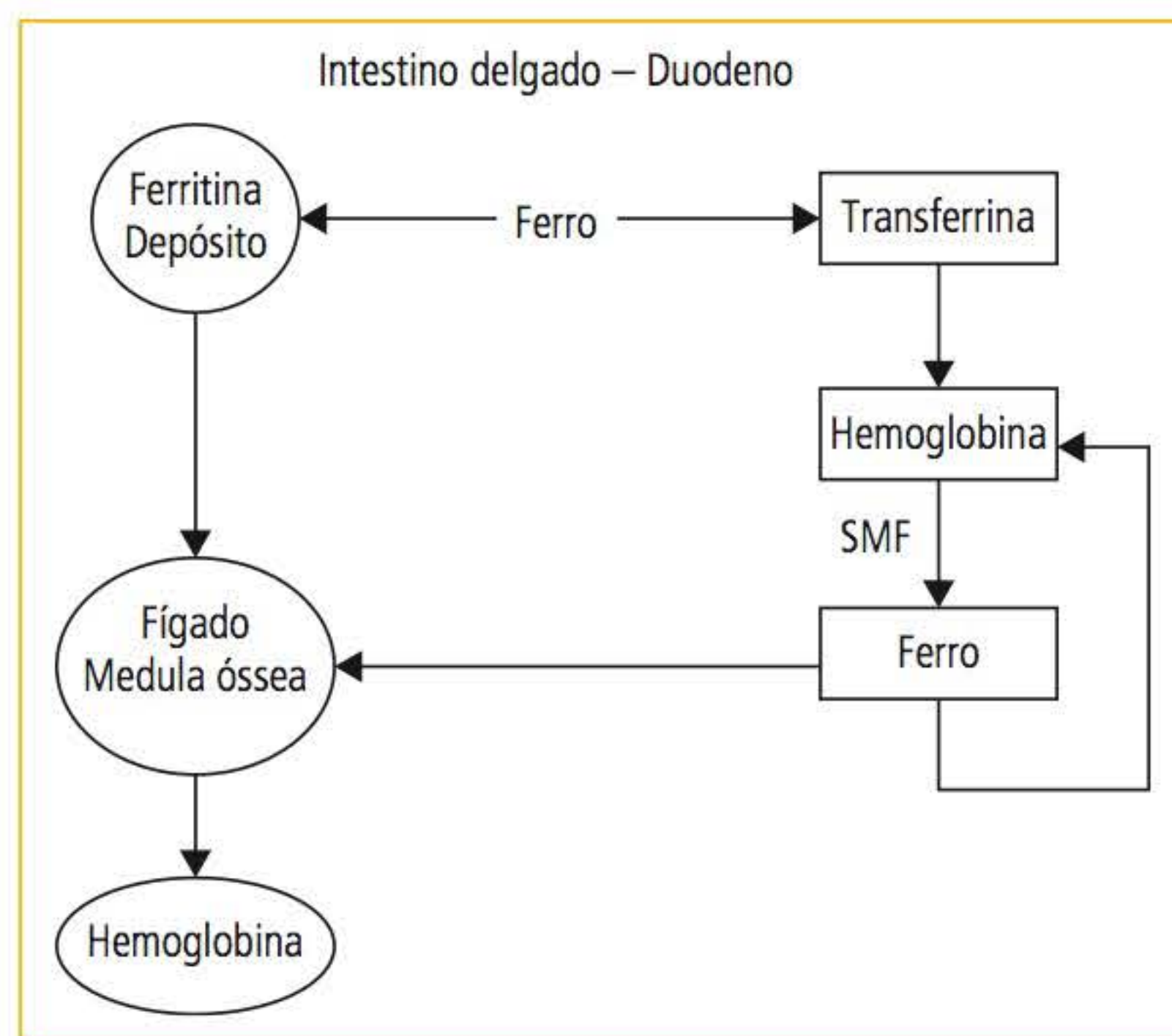
**FIGURA 5.5** Mecanismo de internalização do ferro.

1, ligação do ferro-transferrina ao receptor de transferrina; 2, após a internalização do complexo ferro-transferrina-receptor de transferrina, o ferro é liberado; 3, pelo transporte da DMT1, o ferro pode ser armazenado na forma de ferritina, ou na mitocôndria, quando é utilizado para formar a hemoglobina.  
DMT1, proteína transportadora de metal.



Após o ferro ser internalizado, ele está praticamente em um sistema fechado. A perda de ferro pelo organismo é muito pequena, e ele é eliminado por excreção fecal (0,6 mg/24 h), urinária (0,1 mg/24 h), suor, cabelo e unhas. Durante o ciclo menstrual, a mulher pode perder cerca de 0,4 mg de ferro por dia;<sup>5</sup> essa perda pela menstruação é fisiológica e reposta por aumento da absorção. Anemia ferropriva tem ocorrido em mulheres devido a fluxo menstrual aumentado e, muitas vezes, ela não se dá conta disso, pois o volume eliminado em cada período é o mesmo desde o início da menstruação. A principal causa de anemia ferropriva é o sangramento gastrointestinal, caracterizado como sangramento crônico, em que a perda sanguínea é contínua, mas de pequeno volume.

Os eritrócitos circulam em média 120 dias e, posteriormente, são retirados da circulação pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário (SMF), a hemoglobina é degradada e o ferro fica disponível para se ligar à TRF ou FIT e, ao ligar-se à TRF, vai compor a hemoglobina, a mioglobina e as enzimas que contêm ferro como catalases e peroxidases. Quando ligado à FIT, vai ser encaminhado para os depósitos de ferro, e esta circulação do ferro dentro do organismo é chamada de ciclo interno do ferro, exemplificado na **Figura 5.6**.

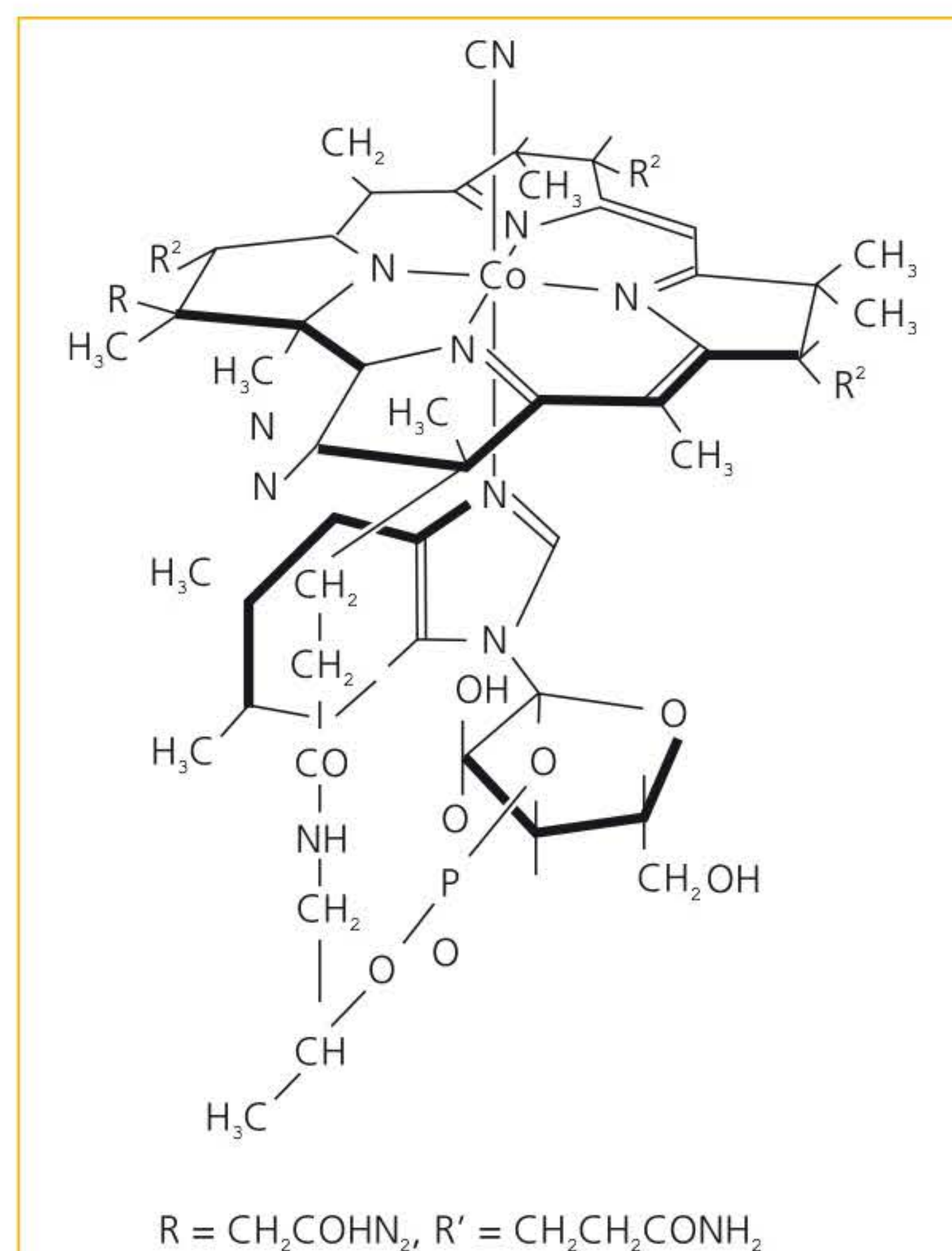


**FIGURA 5.6** Ciclo interno do ferro.

Os compartimentos de ferro no organismo são o ferro hemoglobínico (hemoglobina e ferro ligado à transferrina – é o maior compartimento), ferro de depósito (ferritina e hemossiderina), ferro muscular (mioglobina) e ferro enzimático (catalases e peroxidases).<sup>5</sup>

## VITAMINA B<sub>12</sub> E FOLATO

A vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) é produzida por microrganismos e é encontrada em alimentos como carne, fígado, peixes, ostras, mariscos, rim, ovos, queijos e leite; não é encontrada em vegetais e frutas e é armazenada no fígado.<sup>5</sup> A **Figura 5.7** mostra a estrutura da vitamina B<sub>12</sub>.

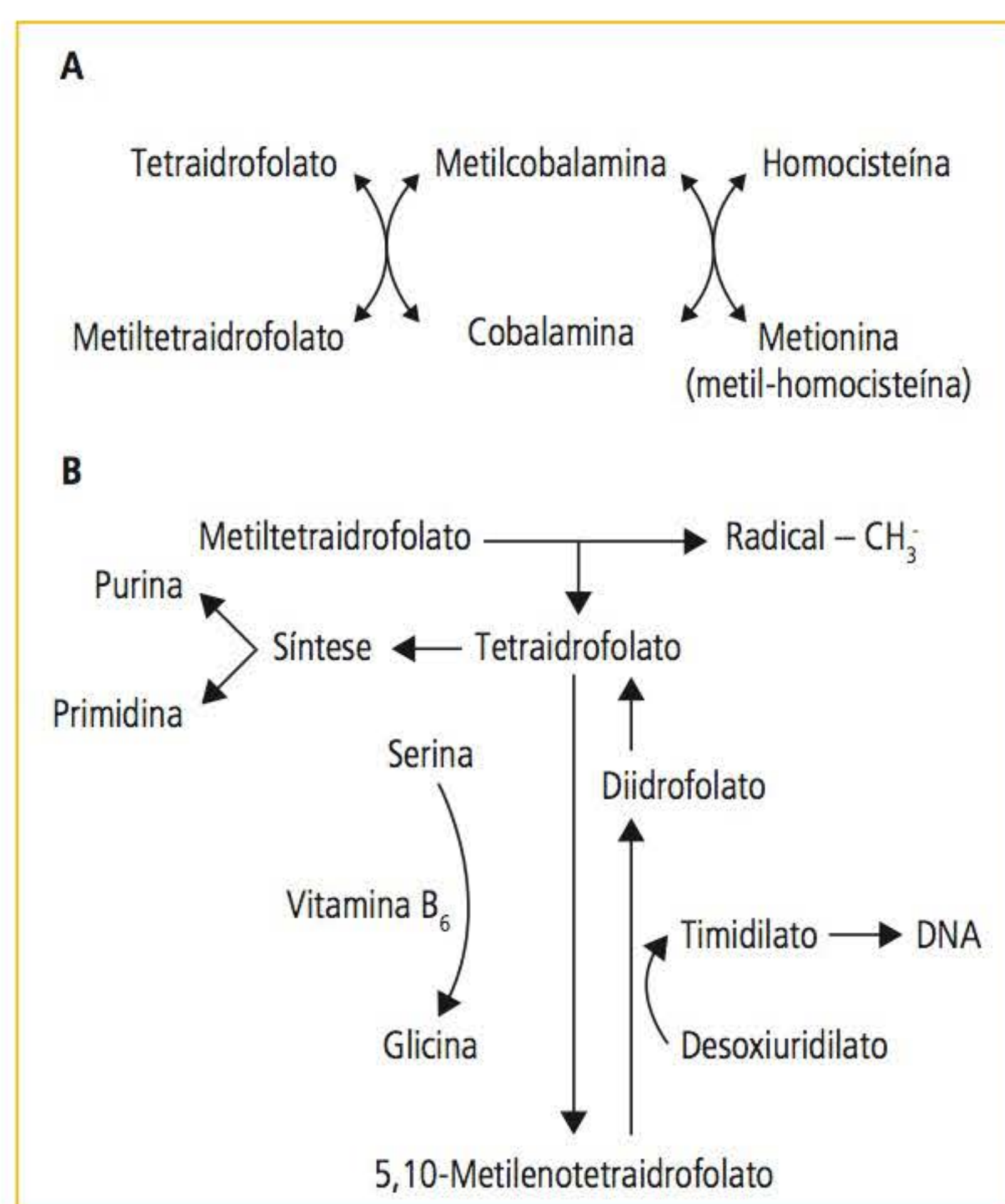


**FIGURA 5.7** Estrutura da vitamina B<sub>12</sub>.

A absorção da vitamina B<sub>12</sub> dá-se no intestino delgado, especificamente no íleo, que é a porção distal do intestino delgado a partir do estômago. Em contato com as pepsinas do suco gástrico, a vitamina B<sub>12</sub> é liberada dos alimentos e liga-se a uma transcobalamina secretada pelas glândulas salivares. Essa ligação é desfeita no duodeno, quando a secreção pancreática neutraliza o pH ácido e a vitamina B<sub>12</sub> fica livre para ligar-se ao fator intrínseco (FI).<sup>5</sup> O FI é produzido pelas células parietais do estômago e liga-se à B<sub>12</sub> no íleo. As células ileais têm receptores para o FI, e quando este se liga à célula ileal, a B<sub>12</sub> é absorvida e transportada ao tecido hepático pelas transcobalaminas para ser armazenada.<sup>5</sup> A dose diária necessária de B<sub>12</sub> é de 1 a 2 µg, e a reserva no organismo é de cerca de 300 µg (mantém-se estável pela absorção diária de B<sub>12</sub>), quantidade suficiente para manter níveis plasmáticos normais durante vários anos.



(em torno de 3 a 6 anos),<sup>15</sup> mesmo com dieta insuficiente. A vitamina B<sub>12</sub> participa da via metabólica de síntese da timina (base nitrogenada que compõe o DNA) e da preservação da bainha de mielina, por isso a deficiência da vitamina B<sub>12</sub> pode levar a alterações neurológicas por desmielinização difusa da coluna medular posterior e lateral.<sup>16</sup> A **Figura 5.8** mostra a via metabólica de síntese da timina.

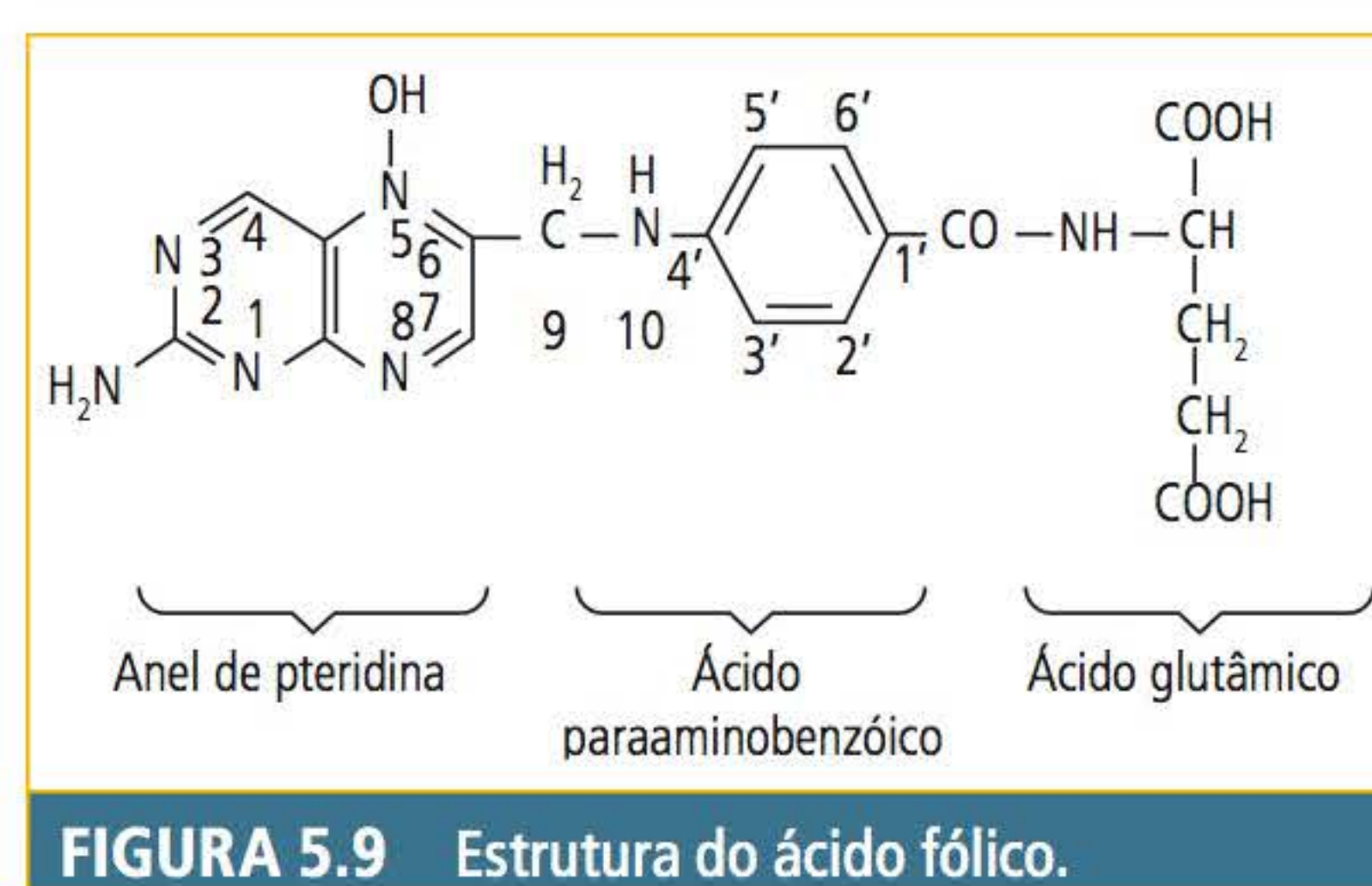


**FIGURA 5.8** Via metabólica de síntese da timina.

As células no organismo humano têm várias funções. Elas devem proliferar, diferenciar e exercer funções específicas nos tecidos em que residem. A proliferação tem a finalidade de repor células perdidas em um determinado tecido ou manter o conjunto de células em número constante. A diferenciação tem o sentido de transformar a célula-tronco em células especializadas. As duas primeiras funções estão relacionadas com a divisão celular, especificamente a mitose. Para que ocorra a mitose, é essencial que a célula duplique o seu conteúdo cromossômico e, para fazer a duplicação, ela necessita de bases nitrogenadas, entre elas a timina. A síntese da timina depende da vitamina B<sub>12</sub> e do ácido fólico; sem B<sub>12</sub> e folato, não há divisão celular, e a consequência hematológica é a anemia megaloblástica.

O ácido fólico, ou folato, é encontrado em vegetais de folhas verdes, couve-flor, brócolis, couve de

bruxelas, cogumelos, frutas, cereais, laticínios, fígado e rim.<sup>5</sup> É assimilado pelo organismo no jejuno por absorção direta. A necessidade diária de folato é de 200 a 400 µg e sua reserva está em torno de 10 a 20 µg.<sup>5</sup> Quantidades maiores de folato são necessárias durante a gestação, lactação e em patologias com intensa proliferação celular.<sup>5</sup> Em caso de dieta inadequada, a reserva de folato esgota-se entre 2 e 4 meses. A **Figura 5.9** mostra a estrutura do ácido fólico.



**FIGURA 5.9** Estrutura do ácido fólico.

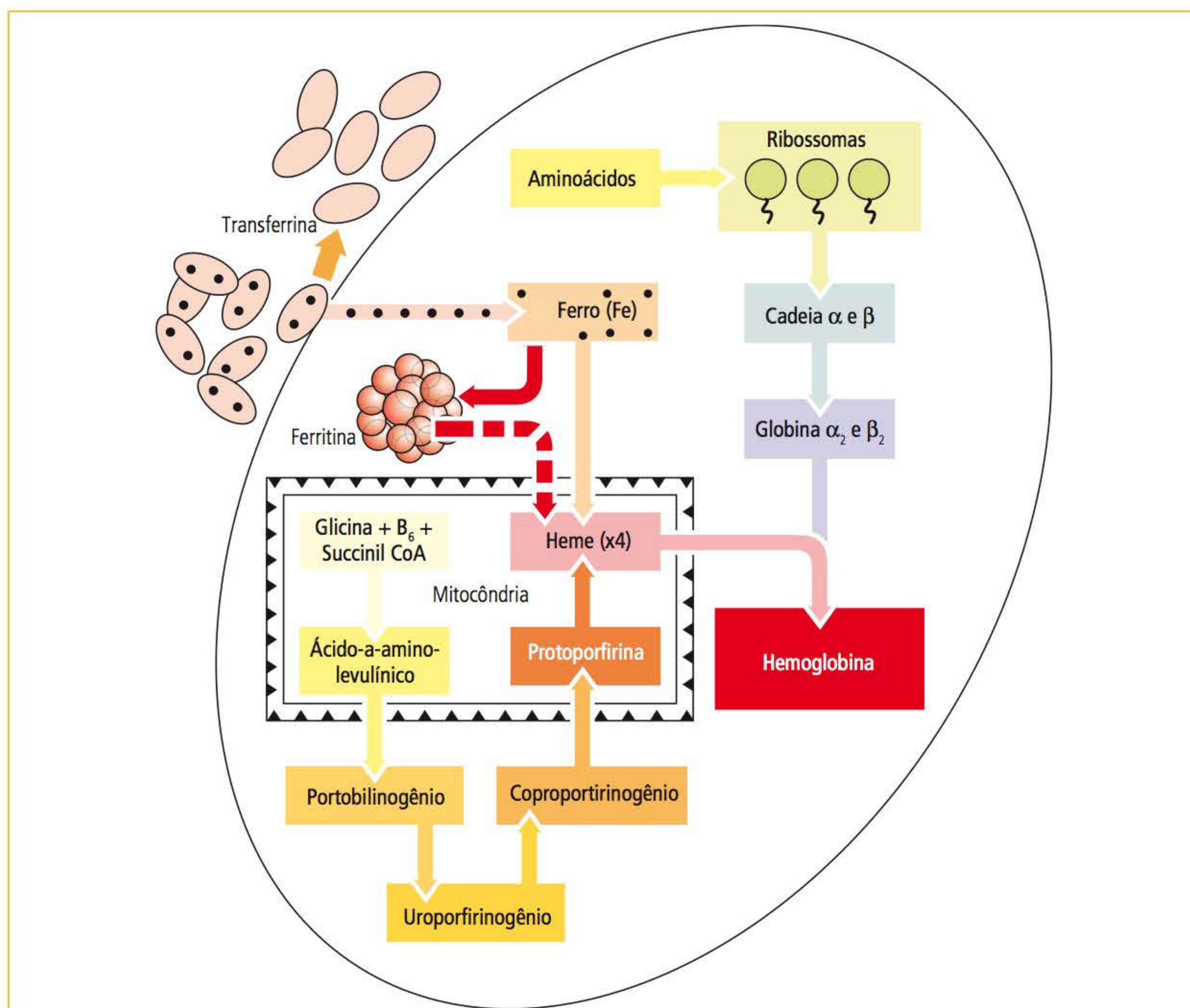
Na deficiência de folato e B<sub>12</sub>, a síntese de DNA está prejudicada pela falta da timina porque a célula, para proliferar, deve duplicar o DNA, o que ocorre na fase S do ciclo celular. Na falta da timina, as células passam da fase G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub> e param ou permanecem por muito tempo na fase S; esse tempo é proporcional à deficiência de B<sub>12</sub> ou folato.<sup>5</sup> Ocorre a perda do sincronismo entre a maturação do núcleo e do citoplasma, o que faz os eritrócitos tornarem-se maiores (volume aumentado) e repletos de hemoglobina, caracterizando um quadro de anemia macrocítica (megaloblástica) e normocrômica. O HCM está aumentado porque a quantidade de hemoglobina é proporcional ao tamanho celular. O CHCM apresenta-se normal porque ele é um valor relativo (o volume celular e a quantidade de hemoglobina aumentam), não absoluto como o HCM.

A deficiência de ácido fólico e B<sub>12</sub> não acomete somente a linhagem eritroide, mas todas as células que entram em divisão. Em termos hematológicos, pode ocorrer um quadro de pancitopenia (anemia, leucopenia e trombocitopenia).

## ■ MOLÉCULA DA HEMOGLOBINA

A síntese da hemoglobina depende de que a célula (1) receba a quantidade de ferro adequada, (2) da produção intracelular da porfirina e (3) da produção de cadeias globínicas<sup>17</sup> (**Figura 5.10**).





**FIGURA 5.10** Síntese da hemoglobina. O ferro é necessário para a formação das porfirinas e, consequentemente, para o grupamento heme, enquanto a síntese de cadeias polipeptídicas depende de condições genéticas.

A hemoglobina é a proteína respiratória presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e apresenta como principal função o transporte de oxigênio por todo organismo. A sua estrutura consta de uma proteína esferoide, globular, formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par de cadeias do tipo  $\alpha$  (alfa [ $\alpha$ ] ou zeta [ $\zeta$ ]) e outro de cadeias do tipo não  $\alpha$  (beta [ $\beta$ ], delta [ $\delta$ ], gama [ $\gamma$ ], épsilon [ $\epsilon$ ]).<sup>18</sup> A estrutura quaternária da hemoglobina majoritária do adulto (Hb A) compreende quatro subunidades polipeptídicas, duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). As cadeias  $\alpha$  são codificadas no cromossomo 16, enquanto as cadeias  $\beta$  são determinadas pelo braço curto do cromossomo 11 (**Figura 5.11**).

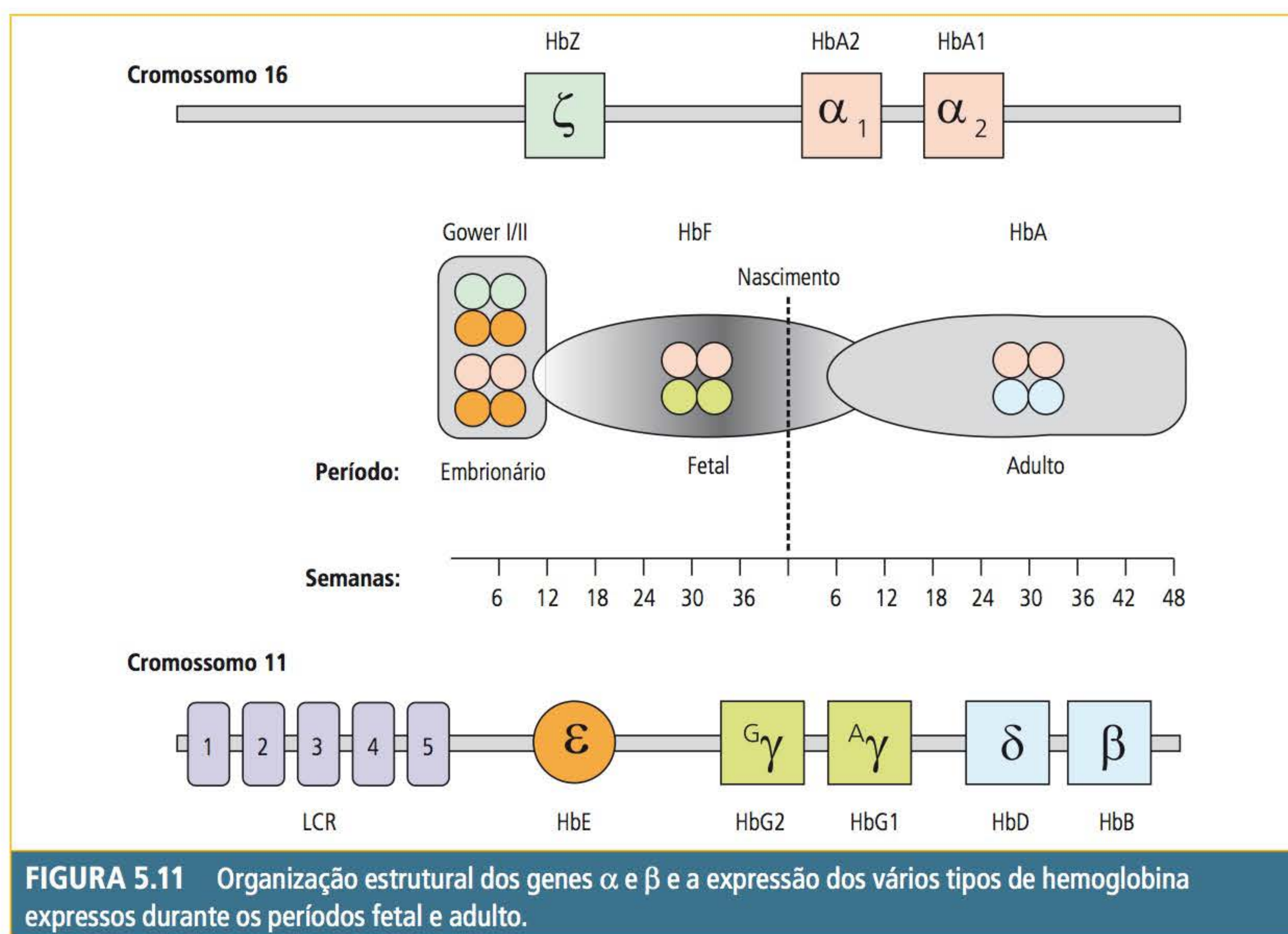
Após a 28ª semana de vida, as concentrações das hemoglobinas chegam às proporções do adulto,

de 96 a 98% para a HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), 2 a 3,7% de HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) e até 1% para a Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) (**Figura 5.12**).<sup>19</sup>

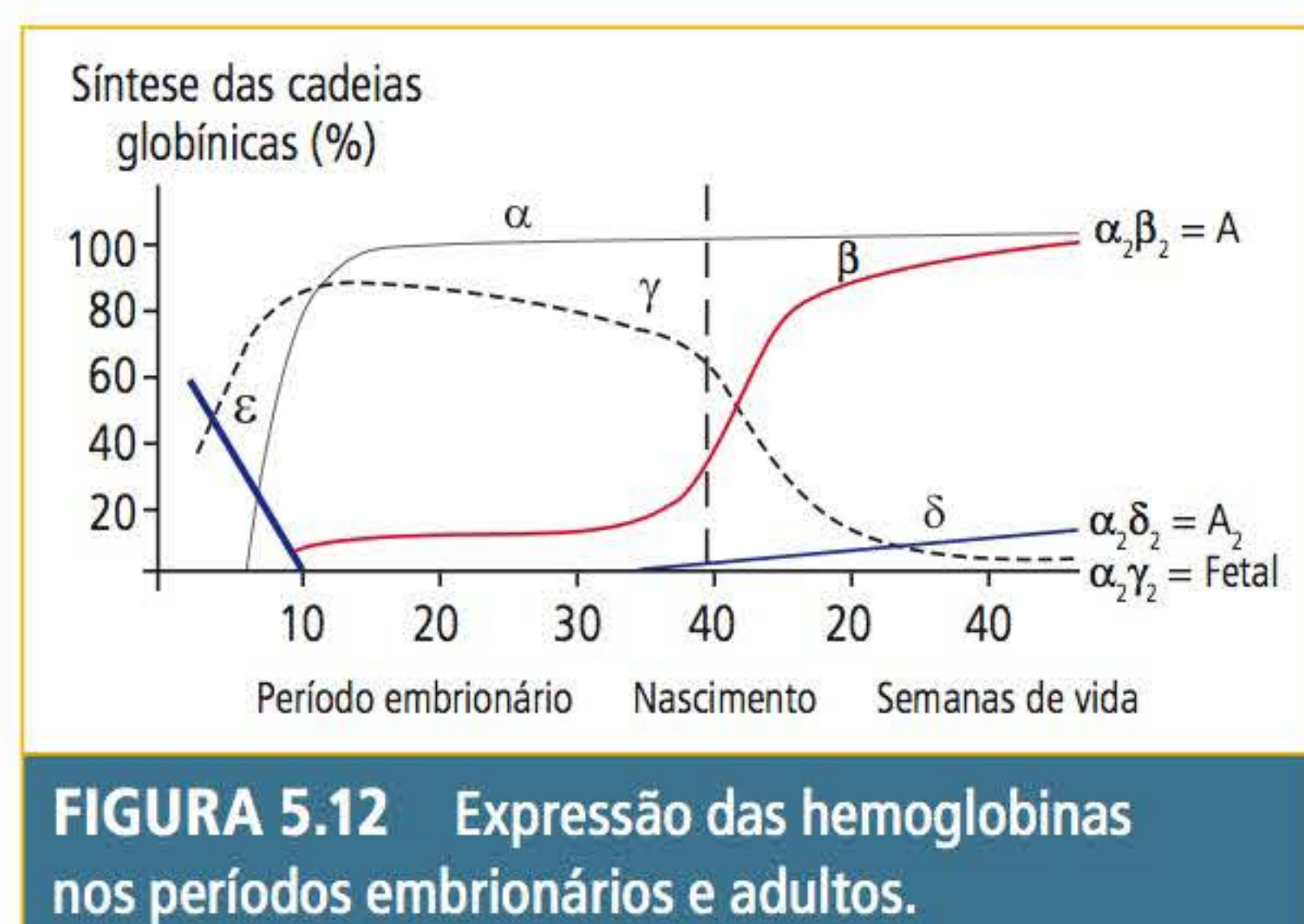
#### ▄ CADEIAS DO TIPO ALFA ( $\alpha$ )

Os genes que codificam as cadeias do tipo  $\alpha$  estão localizados no braço curto do cromossomo 16,<sup>5</sup> e as cadeias polipeptídicas sintetizadas contêm 141 aminoácidos.<sup>1</sup> Os genes produtores de proteína estrutural para as cadeias do tipo  $\alpha$  são:  $\zeta$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . A constituição cromossômica humana é de 46 cromossomos, ou 23 pares de cromossomos homólogos. Como cada indivíduo possui 2 cromossomos 16, o genótipo para a produção normal de cadeia do tipo  $\alpha$  é  $\zeta$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  pelo lado materno e  $\zeta$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  pelo lado paterno. Em termos de genes, necessita-se de dois genes  $\zeta$ , dois genes  $\alpha_1$  e dois genes  $\alpha_2$  ou quatro genes  $\alpha$  para a produção normal de cadeia do tipo  $\alpha$ .





Fonte: Wilber, Nienhuis e Persons.<sup>20</sup>



### CADEIAS DO TIPO BETA ( $\beta$ )

Os genes que codificam as cadeias do tipo  $\beta$  estão localizados no braço curto do cromossomo 11,<sup>5</sup> e a cadeia  $\beta$  possui 146 aminoácidos. Percorrendo-se o cromossomo 11 no sentido 5' para 3', o primeiro gene encontrado é o gene epsilon ( $\epsilon$ ), seguido dos genes gama ( $\gamma$ ), que codifica duas formas protéicas finais: uma rica em glicina ( $\gamma^G$ ) e outra rica em alanina ( $\gamma^A$ ). A proporção entre as cadeias  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  na vida fetal é de 70 e 30%, respectivamente, e, após o nascimento, é de 40 e 60%, também respectivamente.

mente.<sup>21</sup> Posteriormente, há o gene pseudo beta ( $\psi\beta$ ) e os genes delta ( $\delta$ ) e beta ( $\beta$ ). Para a produção normal de cadeias do tipo  $\beta$ , necessita-se de dois genes  $\epsilon$ , dois genes  $\gamma$ , dois genes  $\delta$  e dois genes  $\beta$ .

As cadeias de globina associam-se sempre aos pares, duas cadeias do tipo  $\alpha$  e duas cadeias do tipo  $\beta$ , fazendo uma relação de produção de 1:1 para que não sobre ou falte qualquer tipo de cadeia. Na fase de embrião, formam-se as hemoglobinas embrionárias: Gower I, Portland e Gower II. A Gower I é formada por duas cadeias do tipo  $\alpha$  (zeta  $\zeta_2$ ) e duas cadeias do tipo  $\beta$  (epsilon  $\epsilon_2$ ), a Gower II é formada por duas cadeias do tipo  $\alpha$  (alfa  $\alpha_2$ ) e duas cadeias do tipo  $\beta$  (epsilon  $\epsilon_2$ ), a hemoglobina Portland é formada por duas cadeias do tipo  $\alpha$  (zeta  $\zeta_2$ ) e duas cadeias do tipo  $\beta$  (gama  $\gamma_2$ ).<sup>5</sup> A **Figura 5.13** traz a estrutura das hemoglobinas embrionárias.

Na fase fetal, forma-se um único tipo de hemoglobina, a hemoglobina fetal, que é formada por duas cadeias do tipo  $\alpha$  (alfa  $\alpha_2$ ) e duas cadeias do tipo  $\beta$  (gama  $\gamma_2$ ). Ao nascimento, a hemoglobina fetal perfaz cerca de 70% da hemoglobina total. A concentração da hemoglobina fetal diminui



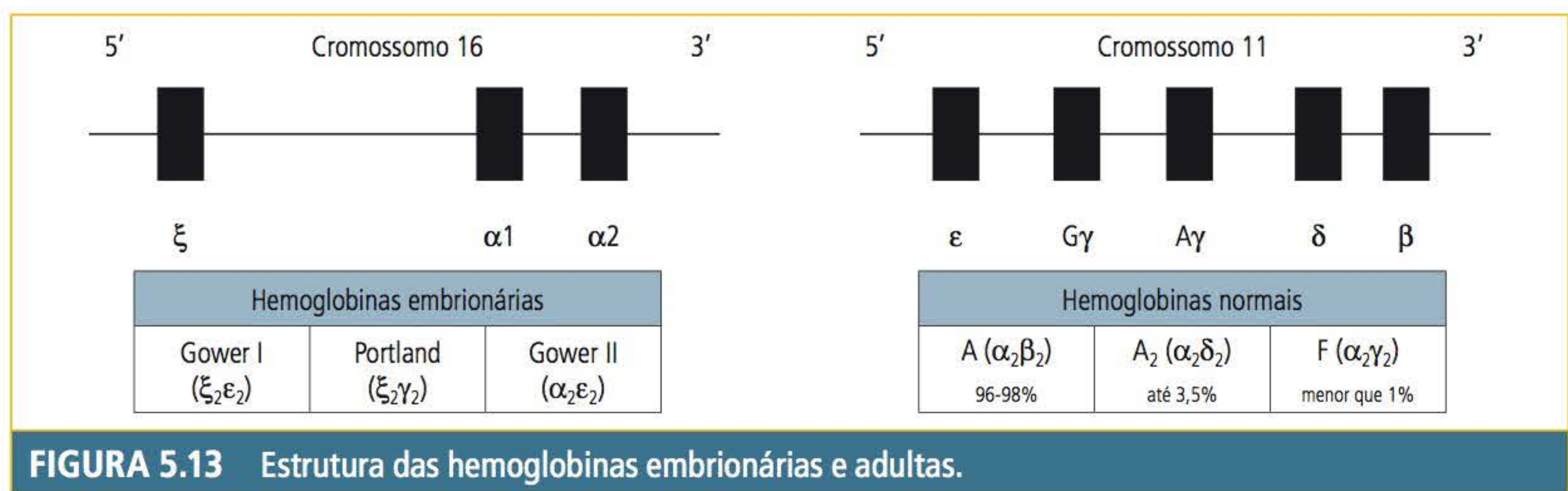


FIGURA 5.13 Estrutura das hemoglobinas embrionárias e adultas.

aproximadamente em 3% a cada semana após o nascimento e, aos 6 meses de vida, a concentração é menor que 3%.<sup>1</sup>

A fase adulta, que, em termos de hemoglobina, configura o pós-nascimento, tem três tipos de hemoglobina: A, A<sub>2</sub> e fetal. A hemoglobina A é constituída de duas cadeias do tipo  $\alpha$  (alfa  $\alpha_2$ ) e duas cadeias do tipo  $\beta$  (beta  $\beta_2$ ) e a hemoglobina A<sub>2</sub> é constituída de duas cadeias do tipo  $\alpha$  (alfa  $\alpha_2$ ) e duas cadeias do tipo  $\beta$  (delta  $\delta_2$ ) (**Figura 5.13**).

A partir da fase fetal, a cadeia  $\alpha$  faz-se presente em todos os tipos de hemoglobina; a cadeia  $\beta$  só se fará presente na fase adulta, quando forma a hemoglobina A. Quando ocorre ausência ou déficit na produção de cadeia  $\alpha$ , as manifestações clínicas estão presentes desde a fase embrionária. Quando há ausência ou deficiência de produção de cadeia  $\beta$ , as manifestações clínicas são observadas após o nascimento.

## ▀ VIA METABÓLICA DE SÍNTESE DO HEME

A palavra hemoglobina deriva da associação do grupo heme com a globina e tem como funções principais: (1) transportar o oxigênio molecular dos pulmões aos tecidos; (2) transportar o CO<sub>2</sub> dos tecidos para os pulmões; e (3) fazer o tamponamento sanguíneo com a finalidade de prevenir mudanças no pH (efeito Bohr).<sup>22</sup> Sua estrutura molecular consiste em quatro cadeias de globina e quatro grupos heme (protoporfirina), aos quais está ligado o átomo de ferro, na forma ferrosa, e é no átomo de ferro que se liga o oxigênio. As cadeias de globina são produzidas pelo processo de síntese de proteínas que inicia com a transcrição do DNA formando o RNA mensageiro e termina na tradução deste nos poliribossomos. A síntese das cadeias de globina deve ser compatível com a fase do desenvolvimento humano e com a integridade do DNA. O anel pirrólico ao qual é incorpo-

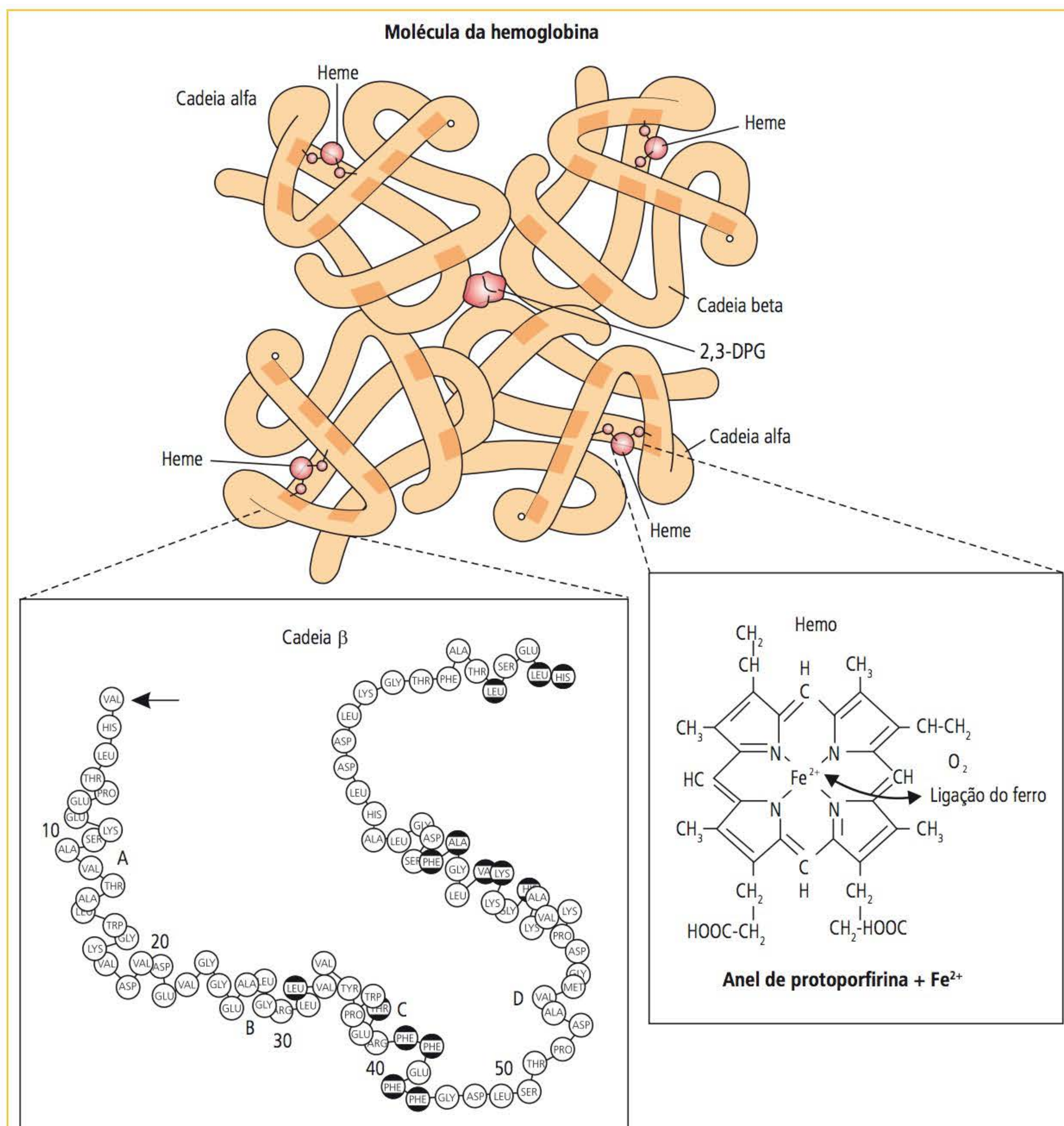
rado o átomo de ferro (e consequentemente o oxigênio) é formado pela via de síntese do heme. A **Figura 5.14** apresenta a representação esquemática da molécula da hemoglobina.

O grupo heme, além de compor a estrutura da hemoglobina, compõe a estrutura das hemoproteínas: mioglobina, citocromos, catalases e peroxidases.<sup>5</sup> A biossíntese do heme inicia na mitocôndria a partir da condensação da succinil coenzima A (CoA) com a glicina, formando o ácido 5- $\Delta$ -aminolevulínico. A CoA é derivada do ciclo do ácido cítrico,<sup>2</sup> e a enzima responsável pela catalização da condensação da CoA com a glicina é a  $\Delta$ -aminolevulinato sintetase (ALA-sintetase).<sup>18</sup> Essa reação enzimática requer um cofator, o piridoxal-5-fosfato. Existem duas formas de ALA-sintetase: uma específica para os eritrócitos e outra que está presente nos demais tecidos – a enzima eritrocitária é sintetizada no cromossomo X e a outra no cromossomo 3.<sup>23</sup>

A condensação de duas moléculas de ácido 5- $\Delta$ -aminolevulínico por ação da enzima  $\Delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-desidratase), que retira duas moléculas de água, dá origem ao porfobilinogênio, uma molécula monopirrólica precursora do heme, clorofila e da cobalamina.<sup>2</sup> A ALA-desidratase é inibida por metais pesados, como o chumbo, e o porfobilinogênio é uma molécula quimicamente instável e reativa, que, em questão de horas, quando exposta ao ar e à luz, desenvolve uma coloração vermelho alaranjada. A formação do porfobilinogênio ocorre no citoplasma e não mais na mitocôndria. A via metabólica de formação do heme continua no citoplasma até a formação do coproporfirinogênio III.<sup>2</sup>

A enzima porfobilinogênio deaminase catalisa a condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio e forma um composto tetrapirrólico linear, pela retirada de 4 grupamentos amino, que é





**FIGURA 5.14** Representação esquemática da molécula da hemoglobina.

o hidroximetilbilano (HMB). A uroporfirinogênio III sintetase, pela retirada de água, forma o uroporfirinogênio III, precursor de todos os anéis tetrapirrólicos funcionais.<sup>2</sup>

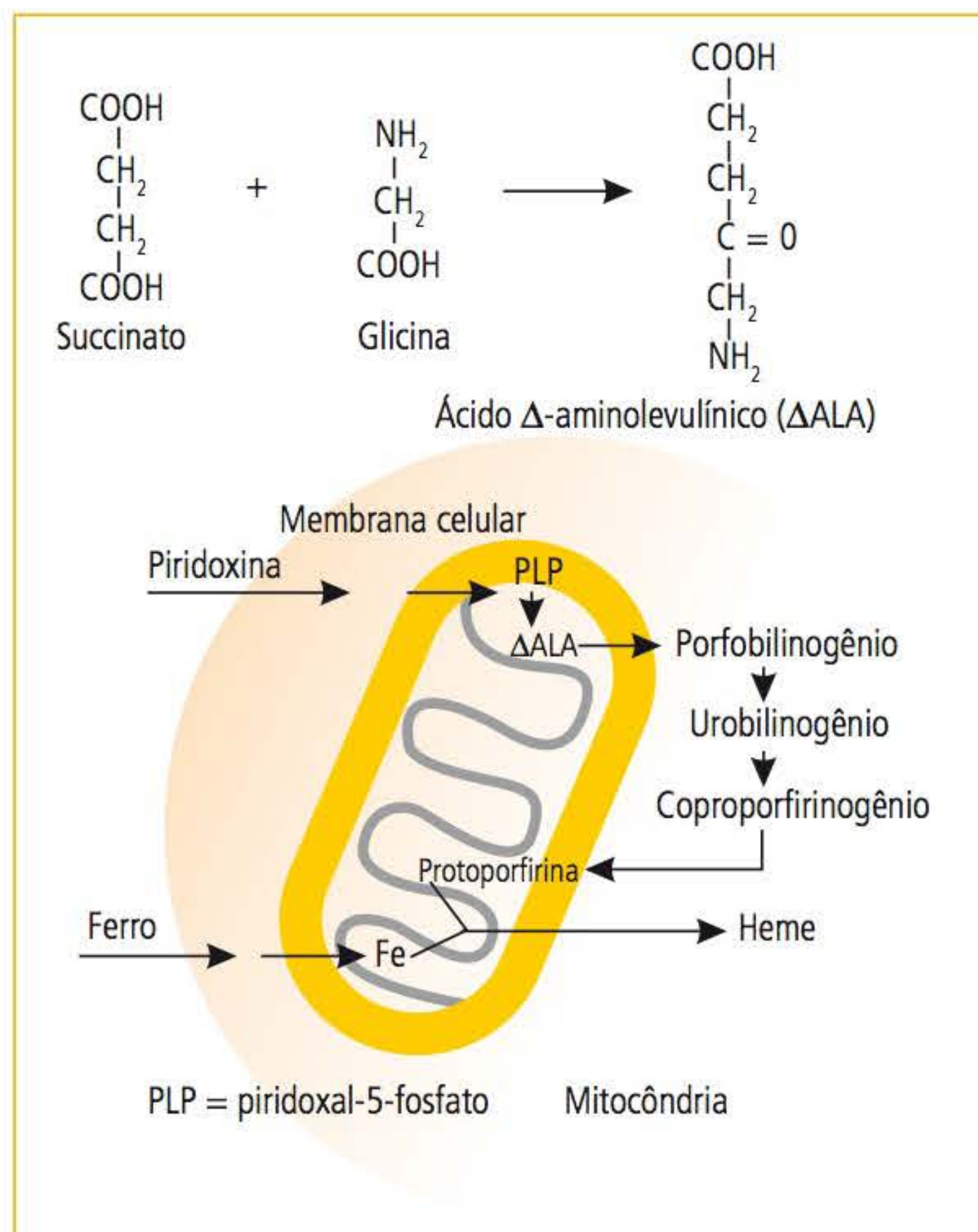
A enzima uroporfirinogênio III descarboxilase retira 4 grupos carboxílicos do uroporfirinogênio III e forma o coproporfirinogênio III. A coproporfirinogênio III oxidase, agora no interior da mitocôndria, remove grupos carboxilas e hidrogênios e forma grupos vinil, originando a molécula do protoporfirinogênio III. A protoporfirinogênio III oxidase catalisa a remoção de seis átomos de hidrogênio

e forma a protoporfirina IX, e a ferro quelatase retira dois átomos de hidrogênio e incorpora o ferro, na forma ferrosa, na protoporfirina IX, formando a forma final do grupamento heme.<sup>5</sup>

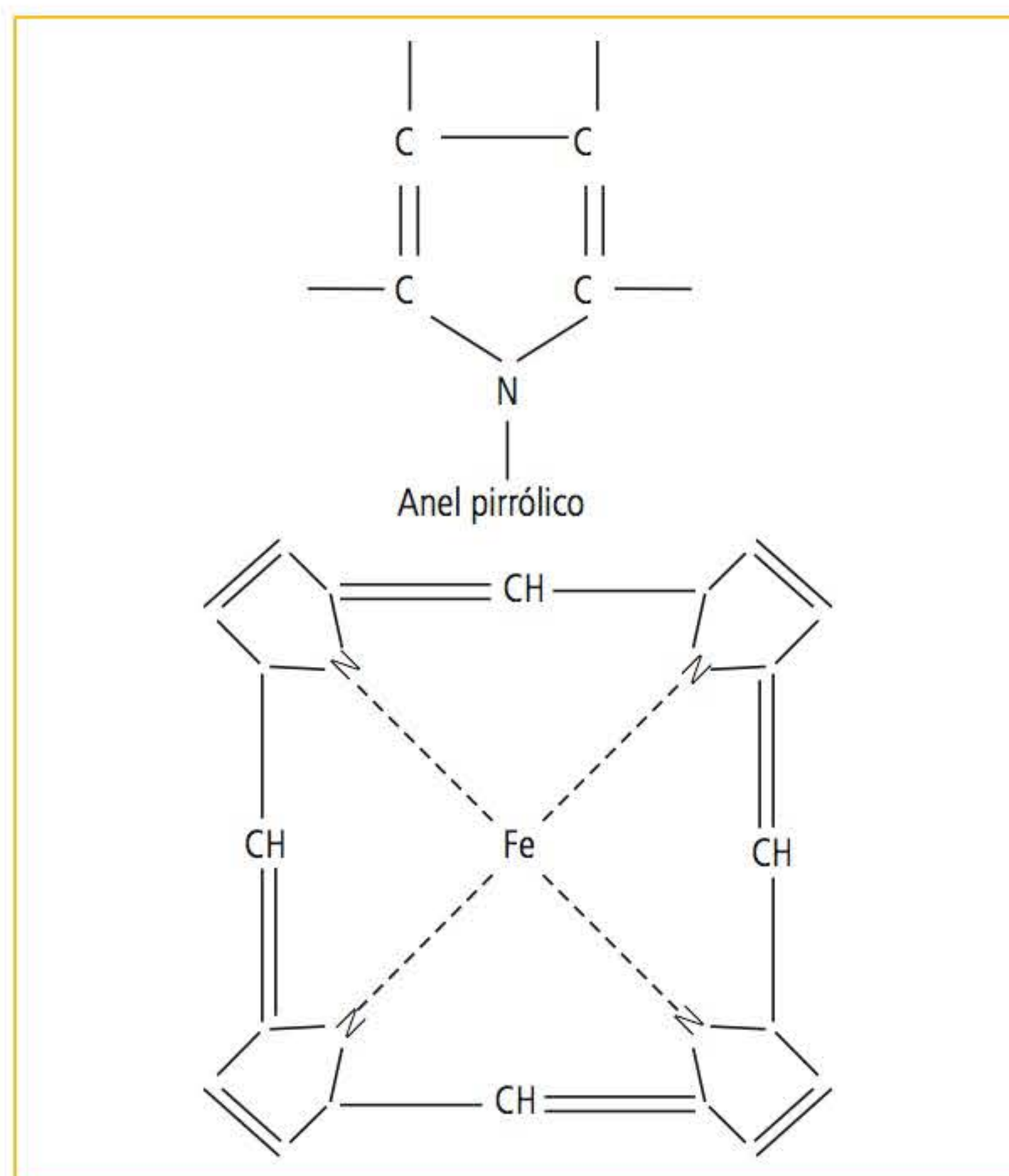
A via metabólica de síntese do heme é controlada pela enzima ALA-sintetase. Níveis de heme elevados inibem a síntese da enzima, e baixos níveis induzem a formação.<sup>2</sup> A ALA-sintetase, após ser sintetizada nos polirribossomos, é transportada e modificada na membrana interna da mitocôndria.<sup>7</sup> A forma citoplasmática, provavelmente, é um precursor da forma mitocondrial (forma



ativa da enzima na via metabólica do heme).<sup>24</sup> O heme também regula a síntese das cadeias de globina.<sup>2</sup> Em torno de 85% do heme é sintetizado na medula óssea e o restante no fígado.<sup>5</sup> A **Figura 5.15** mostra via metabólica do heme e a **Figura 5.16** o grupamento heme.



**FIGURA 5.15** Via metabólica da síntese do heme.



**FIGURA 5.16** Grupamento heme.

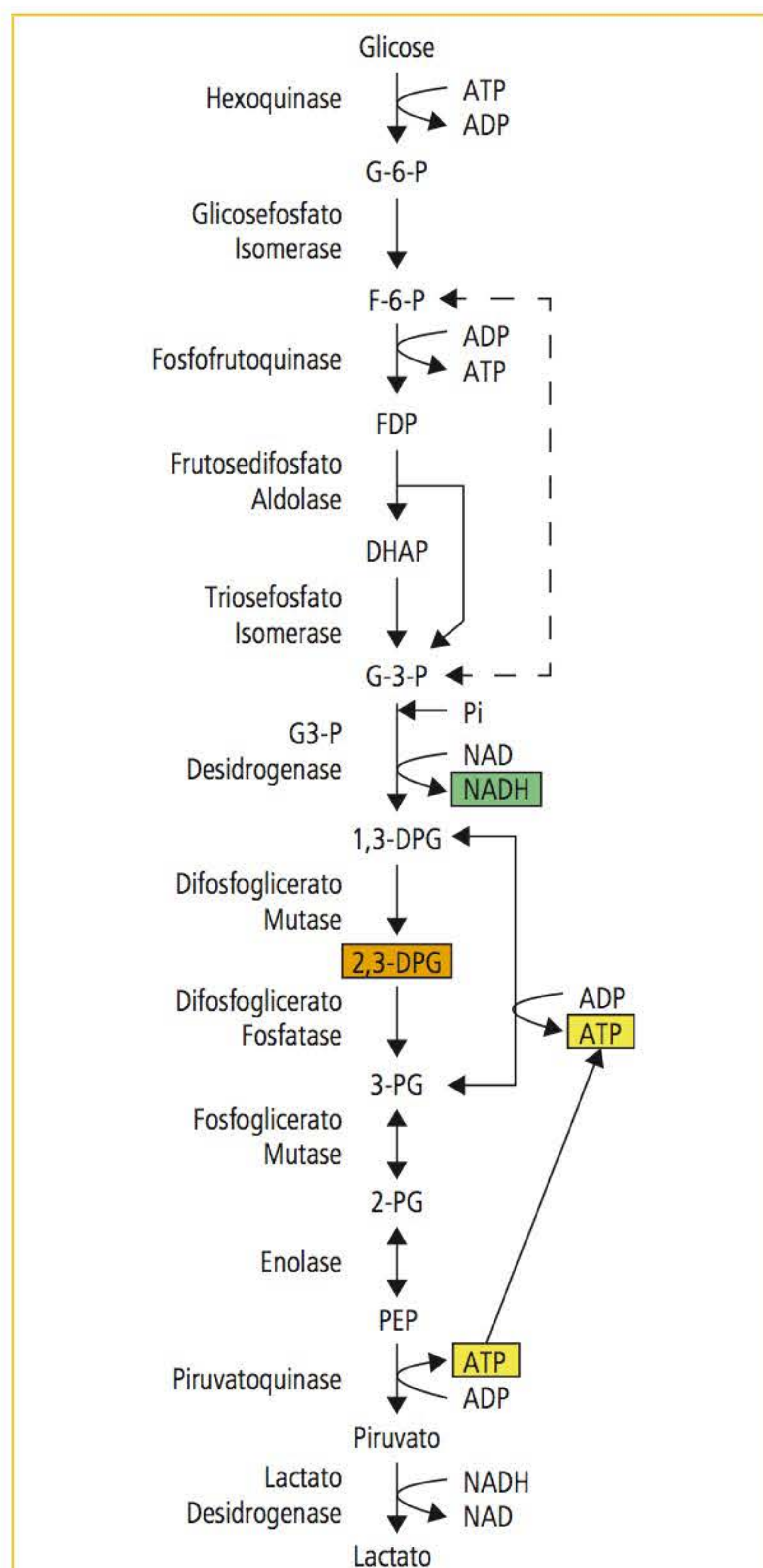
## METABOLISMO ENERGÉTICO DO ERITRÓCITO

Uma vez que o eritrócito maduro alcança a circulação periférica, o mesmo está cheio de hemoglobina e apto a realizar a sua função, ou seja, transportar o oxigênio dos pulmões para os tecidos e circular em média 120 dias. Para que o eritrócito possa permanecer em circulação durante esse tempo, ele necessita de energia, que é retirada da degradação da glicose, captada a partir do plasma e transformada em energia a partir de enzimas intraeritrocitárias. A sobrevivência eritrocitária está diretamente relacionada com a capacidade de degradar a glicose e, para isso, o eritrócito deve ter todas as enzimas necessárias, em concentrações normais. A degradação da glicose gera energia que o capacita para manter a integridade da membrana eritrocitária, impedir a oxidação da hemoglobina, a passagem do ferro da forma ferrosa à férrica e para manter a forma bicôncava do eritrócito. Quando o eritrócito está privado de energia, a alteração da bomba de cátions permite que ele adquira uma forma esférica sendo, desse modo, é retirado da corrente circulatória pelo baço.

A degradação da glicose é feita pela via de Embden-Meyerhof ou glicólise anaeróbica. A glicose é degradada a piruvato e lactato, sendo que esta via degrada 90%<sup>2</sup> da glicose que entra no eritrócito produzindo ATP (adenosina trifosfato), NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo [estado de oxidação reduzido]) e 2,3-difosfoglicerato (2,3DPG). O lactato e o piruvato são retirados do eritrócito e metabolizados pelo organismo. A ATP é importante na manutenção da bomba de cátions, a NADH mantém a hemoglobina na forma oxidada e o 2,3DPG regula a afeição da hemoglobina pelo oxigênio. O 2,3DPG é formado na via de Embden-Meyerhof, no desvio de Luebering-Rapoport (**Figura 5.17**).

A via da pentose monofosfato ou *shunt* das pentoses, uma via derivada da via de Embden-Meyerhof a partir da glicose-6-fosfato, é uma glicólise aeróbica que degrada entre 5 e 10%<sup>2</sup> da glicose e produz como produto principal o NADPH, cofator na redução da glutatona oxidada. O NADPH é o principal agente protetor contra ataques oxidativos que a célula sofre e é o principal estímulo para a utilização da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). A glicose-6-fosfato, produzida na via glicolítica de Embden-Meyerhof, entra para o *shunt* das pentoses, onde é convertida a 6-fosfogliconato pela G-6-PD. Nessa conversão, é gerado NADPH a partir do NADP. O NADPH é reduzido





**FIGURA 5.17** Via de Embden-Meyerhof ou glicose anaeróbica.

a NADP pela enzima glutathiona redutase; com isso, a glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida a GSH (glutathiona reduzida). A enzima glutathiona peroxidase oxida o GSH, fazendo com que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) seja transformado em água. A função da GSH e, por conseguinte, da G-6-PD, é transformar o  $H_2O_2$ , formado espontaneamente ou por ação de medicamentos, em água e, com isso, evitar o estresse oxidativo (**Figura 5.18**).

## ■ CIRCULAÇÃO ERITROCITÁRIA – MEMBRANA ERITROCITÁRIA

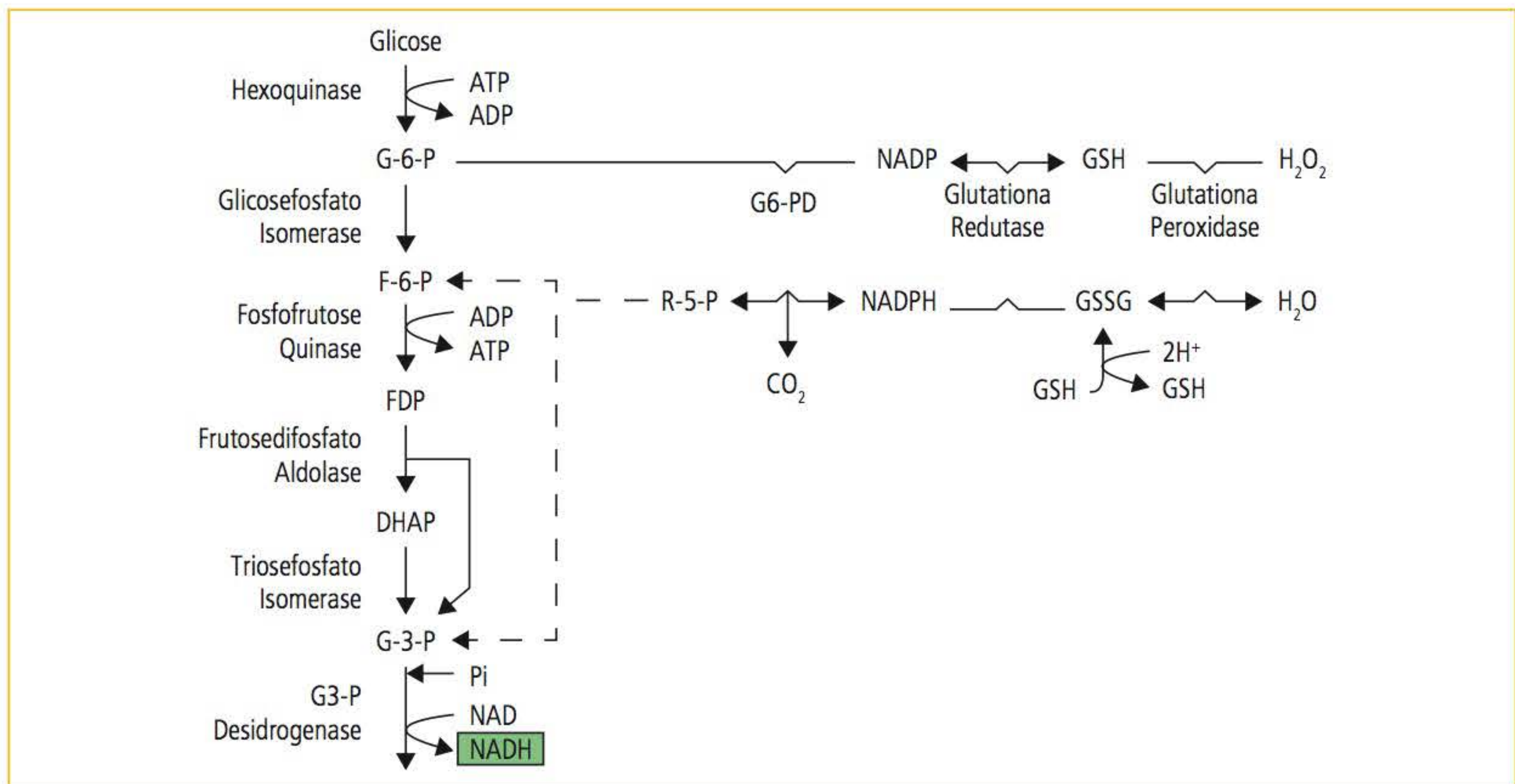
A membrana eritrocitária é constituída de lipídeos e proteínas. Os lipídeos compõem cerca de 50 a

60% da membrana, sendo que os principais lipídeos são os fosfolipídeos e o colesterol presentes em igual quantidade. Eles participam na regulação do transporte de cálcio e das interações das proteínas transmembrana com o citoesqueleto. As proteínas da membrana eritrocitária podem ser divididas em proteínas integrais (estão na membrana eritrocitária) e periféricas (compõem o citoesqueleto). Classificadas como integrais, estão as proteínas como a banda 3 e as glicoforinas. A espectrina, anquirina, proteína 4.1, proteína 4.2, p55, actina e aducina são classificadas como periféricas.<sup>1</sup>

A proteína banda 3 é uma glicoproteína transmembrana que tem a finalidade de regular o conteúdo iônico, a deformabilidade celular e, provavelmente, a senescência celular,<sup>25</sup> além de ainda apresentar sítios de ligação para outras proteínas da membrana, entre elas a anquirina, proteína 4.1 e 4.2 e estar associada com glicoproteínas do sistema Rh.<sup>26</sup> O seu domínio extracelular são antígenos de vários grupos sanguíneos, entre eles os grupos Diego e Wright. As glicoforinas são glicoproteínas ricas em ácido siálico (constituem mais de 60% da carga negativa do eritrócito), estão presentes nas formas A, B, C e D e modulam as interações entre os eritrócitos e do eritrócito com a célula endotelial. A glicoforina C interage com a proteína 4.1 e com a p55, tendo um papel importante na deformabilidade e forma celular.<sup>1</sup>

A espectrina é a proteína mais abundante do citoesqueleto, e a estrutura básica da molécula é formada pelos heterodímeros  $\alpha$  e  $\beta$ , que se associam para formar tetrâmeros.<sup>27</sup> Os tetrâmeros associam-se e formam uma rede multimolecular capaz de manter a forma e a capacidade de deformação da célula.<sup>28</sup> A espectrina se liga à actina e à proteína 4.1 e tem as funções de regular a mobilidade das proteínas integrais, manter a forma celular e dar um suporte estrutural para a membrana lipoproteica.<sup>1</sup> A anquirina tem a função de manter a estabilidade da membrana. A proteína 4.1 é uma fosfoproteína que tem a finalidade de fazer a ligação da espectrina-actina com o domínio intracelular da proteína banda 3 e com o domínio intracelular da glicoforina C/p55.<sup>27</sup> A proteína 4.2 pertence à família das proteínas transglutaminases e sua principal função é estabilizar a associação espectrina-actina-anquirina com a proteína banda 3.<sup>1</sup> A p55 é uma fosfoproteína que se une à proteína 4.1.<sup>29</sup> Todas essas proteínas se associam em dois tipos de interações: as verticais e as horizontais. As primeiras





**FIGURA 5.18** Via de pentose monofosfato ou *shunt* das pentoses: via derivada da via de Embden-Meyerhof.

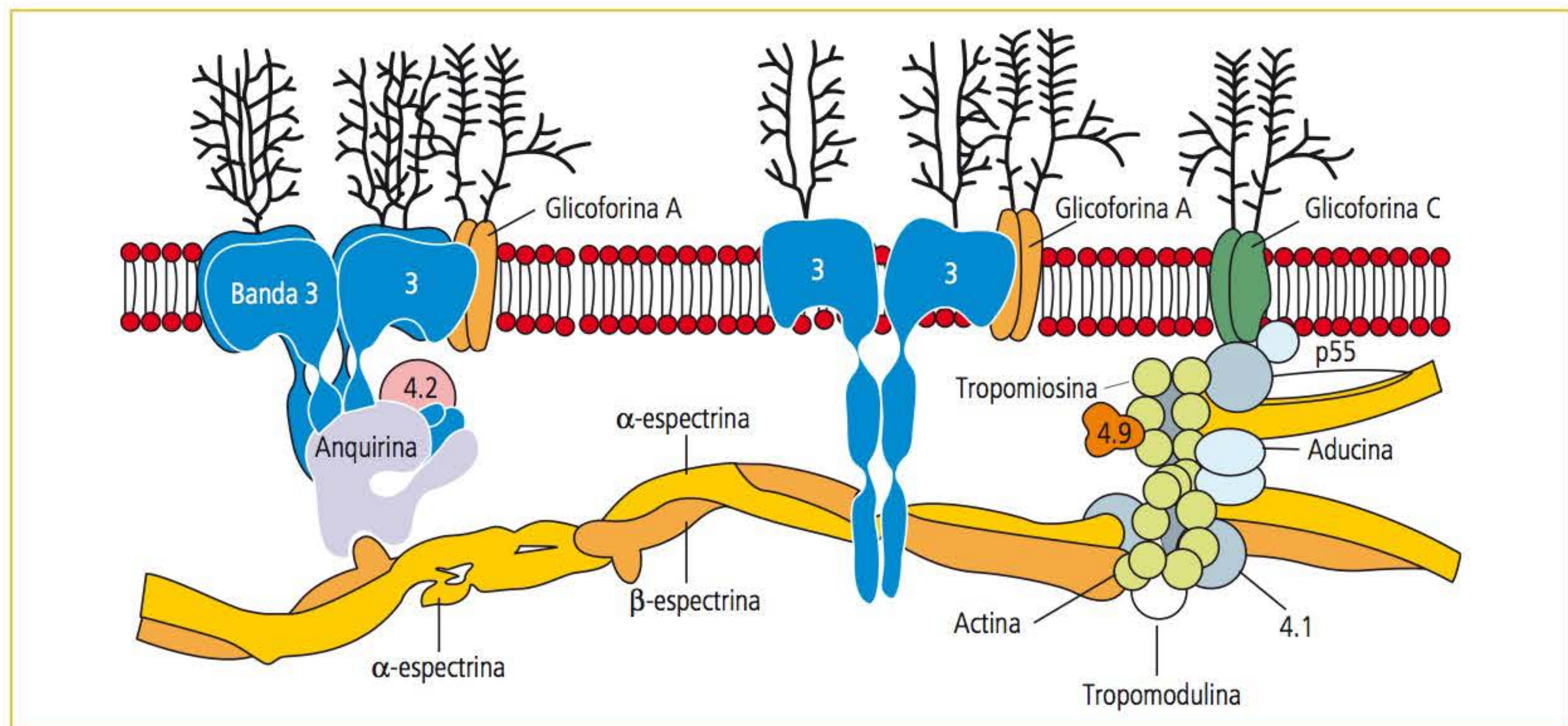
ocorrem entre a espectrina, proteína 4.2, as glicoforinas e anquirina, que são interações proteína-proteína e proteína-lipídeo responsáveis pela estabilização da membrana de lipídeos, evitando que haja perda.<sup>1</sup> As interações horizontais ocorrem entre a espectrina, proteína 4.1 e actina. A **Figura 5.19** mostra um esquema das proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário.

O eritrócito é uma célula que passa por capilares muito menores que o seu tamanho, tanto no sangue, quanto em órgãos como o baço. Para que ele possa circular em capilares, arteríolas e vênulas,

elas, tem de ter a capacidade de se deformar (maleabilidade). O que concorre para essa propriedade fundamental do eritrócito é a sua forma bicôncava, a viscosidade citoplasmática determinada pelo conteúdo de hemoglobina e a elasticidade e viscosidade da membrana citoplasmática,<sup>1</sup> determinada pelas proteínas e fosfolipídeos da membrana e pelas proteínas do citoesqueleto.

## DESTRUIÇÃO ERITROCITÁRIA

A vida média do eritrócito está em torno de 100 a 140 dias<sup>30</sup> e, durante este período de vida, calcula-se



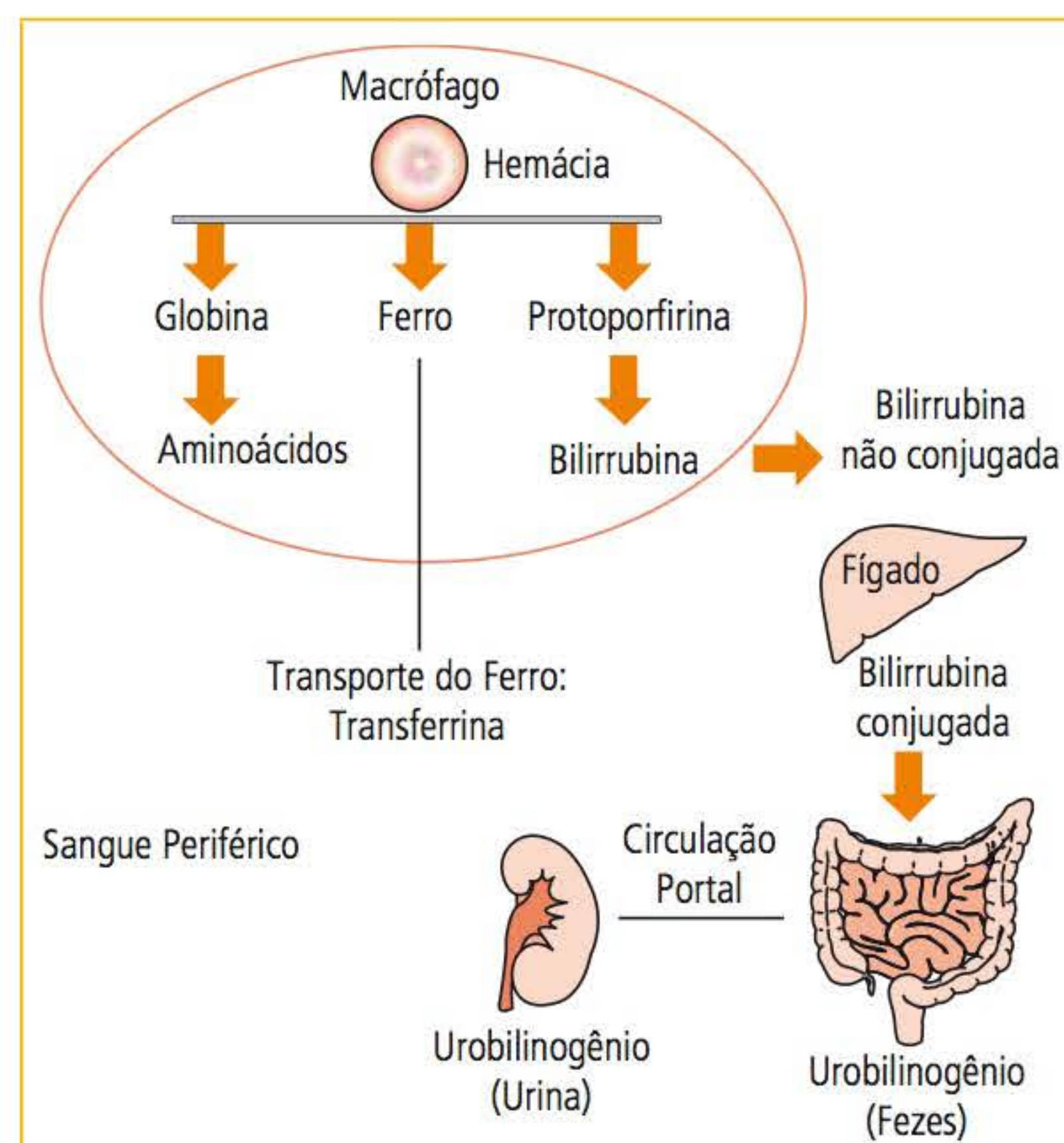
**FIGURA 5.19** Esquema das proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário.



que o eritrócito percorra uma distância de 480 km.<sup>31</sup> Como o eritrócito não pode sintetizar proteínas, ele perde o núcleo durante a maturação, mantendo-se vivo pelo consumo das enzimas eritrocitárias, que fazem a degradação da glicose na via de Embden-Meyerhof. Os eritrócitos senescentes também apresentam mudanças no balanço de cálcio, aumentam a concentração de cálcio intracelular, diminuem o potássio intracelular, desidratam, aumentam a densidade e viscosidade celular e diminuem a capacidade de deformabilidade.<sup>2</sup> Ocorre também uma diminuição na carga negativa (redução da quantidade de ácido siálico na membrana) do eritrócito (potencial  $\zeta$ ), o que facilita a interação do eritrócito com os macrófagos, com consequente aumento da fagocitose. A diminuição da concentração de G-6-PD permite que a quantidade de radicais livres aumente com consequente dano à membrana eritrocitária, ao citoesqueleto e à hemoglobina. O eritrócito senescente pode ser retirado da corrente sanguínea de modo intravascular ou extravascular. A primeira forma de destruição eritrocitária ocorre no interior dos vasos sanguíneos, e a segunda ocorre no baço. A destruição intravascular responde por 10% da hemólise fisiológica e a extravascular por 90%.

A hemólise extravascular ocorre no sistema mononuclear fagocitário, que é composto por baço, fígado, linfonodos e medula óssea. A destruição ocorre porque os macrófagos localizados nesses órgãos fagocitam o eritrócito senescente, retirando-o da circulação. Após a fagocitose (agora o eritrócito está no interior do macrófago esplênico), quando a membrana celular se rompe, a hemoglobina é liberada e degradada em globina e heme. A globina vai ser decomposta em aminoácidos, os quais vão compor o *pool* de aminoácidos do organismo. O ferro retirado do heme une-se à transferrina e é transportado para a medula óssea para ser reaproveitado na síntese de hemoglobina. O anel pirrólico, por meio de ação da heme oxigenase, produz o monóxido de carbono, eliminado pelos pulmões, e o composto biliverdina, que é reduzido a bilirrubina e passa ao plasma como bilirrubina indireta, não conjugada. A bilirrubina indireta une-se à albumina, e o complexo (bilirrubina indireta-albumina) é internalizado no hepatócito. Quando ocorre a dissociação da albumina, a bilirrubina é transformada em sua forma direta por conjugação com o ácido glicurônico em presença da enzima glicuronil transferase. A bilirrubina direta é excretada na bile e eliminada como urobilinogênio

fecal. Parte do urobilinogênio é reabsorvido pela circulação enterohepática e é eliminado via renal como urobilinogênio urinário. O achado laboratorial característico de hemólise extravascular é o aumento da bilirrubina indireta. A **Figura 5.20** mostra o mecanismo da hemólise extravascular.

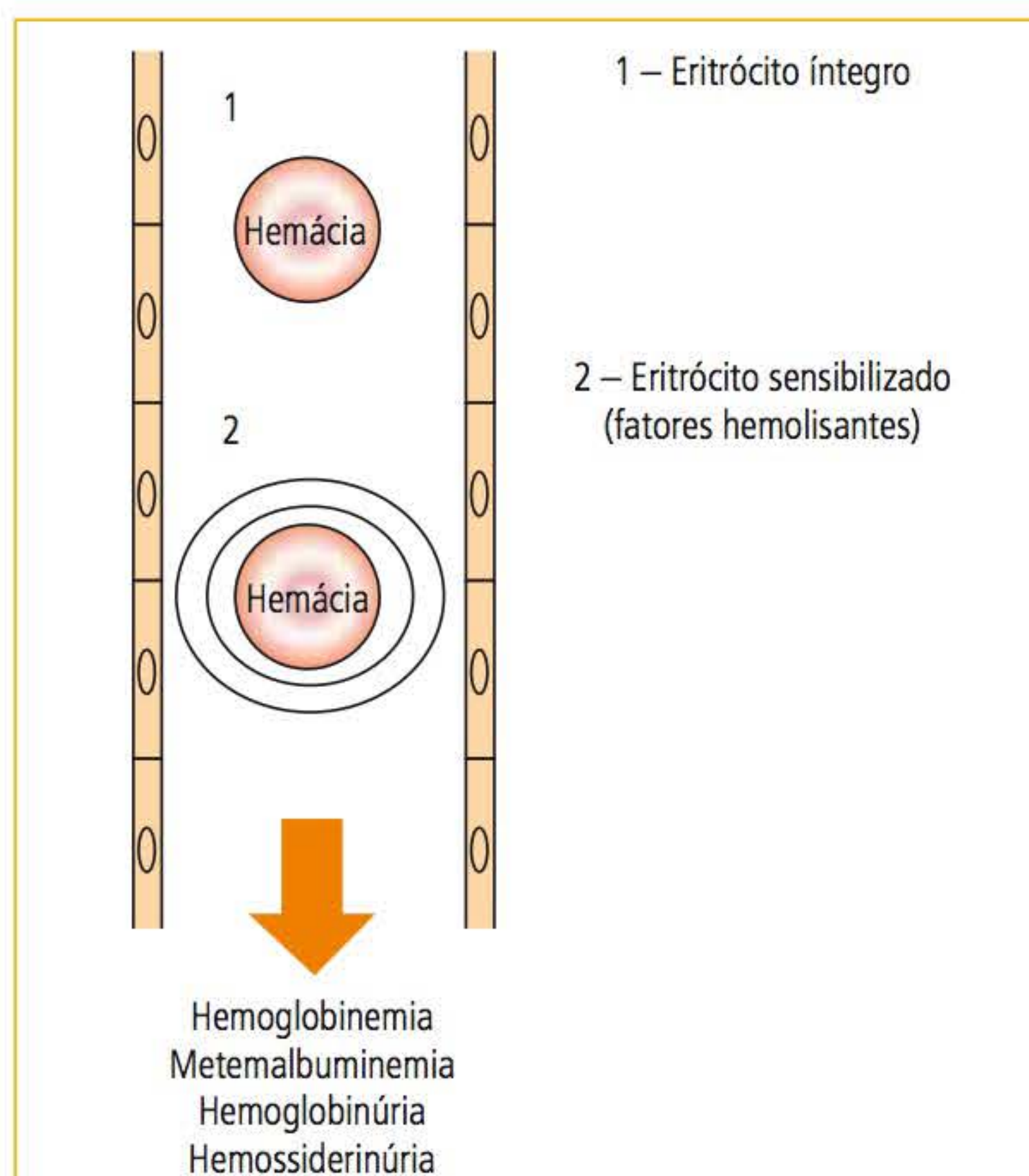


**FIGURA 5.20** Mecanismo da hemólise extravascular.

A hemólise intravascular caracteriza-se pela liberação da hemoglobina no plasma (hemoglobinemias) e envolve a ação dos componentes do complemento. A hemoglobina livre pode ser oxidada a meta-hemoglobina, que vai ser degradada em globina e heme. A globina comporá o *pool* de aminoácidos. O heme une-se à hemopexina e é transportado ao hepatócito. No tecido hepático, o ferro une-se à transferrina, depois será transportado para a medula óssea e reaproveitado na síntese de hemoglobina. O anel pirrólico sofrerá conjugação, formando o diglicuronato de bilirrubina e eliminado como urobilinogênio fecal. A hemoglobina que não foi oxidada combina-se com a haptoglobina e é transportada ao tecido hepático para ser eliminada. Quando a capacidade de ligação da haptoglobina com a hemoglobina é excedida, a hemoglobina livre presente no plasma é filtrada pelo rim e será evidenciada na urina como hemoglobinúria. A hemoglobina na urina pode ser oxidada a meta-hemoglobina e detecta-se meta-hemoglobinúria. Os achados laboratoriais característicos de hemólise intravascular são hemoglobinúria, meta-hemoglobinúria e hemossidenúria e, no plasma, aumento da



hemoglobina plasmática. O mecanismo da hemólise intravascular está ilustrado na **Figura 5.21**.



**FIGURA 5.21** Mecanismo de hemólise intravascular.

## REFERÊNCIAS

1. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
2. Greer JP, Foerster J, Lukens JN. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
3. Tanaka Y, Goodman JR. Electron microscopy of human blood cells. New York: Harper & Row; 1972.
4. Kilmann SA. On the size of normal human reticulocytes. Acta Med Scand. 1964;176:529.
5. Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do eritrograma. São Paulo: Lovise; 1999.
6. Schmidt CA, Ramos AS, Silva JEP, Fronza M, Dalmora SL. Avaliação da atividade e caracterização da eritropoetina humana recombinante em produtos farmacêuticos. Arq Bras Endocrinol Metab. 2003;47(2):183-9.
7. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science. 1988;242(4884):1412-5.
8. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. Science. 1990;248(4953):378-81.
9. Beutler E, Fairbanks VF, Fahey JL. Clinical disorders of iron metabolism. New York: Grune & Stratton; 1963.
10. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. Science. 2001;291(5509):1755-9.
11. Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC, Schmid R. Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. J Clin Invest. 1974;54(6):1344-52.
12. Thorbecke GJ, Liem HH, Knight S, Cox K, Muller-Eberhard U. Sites of formation of the serum proteins transferrin and hemopexin. J Clin Invest. 1973;52(3):725-31.
13. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem. 2001;276(11):7806-10.
14. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(15):8780-5.
15. Grant JP. Handbook of total parenteral nutrition. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992.
16. Silva MTT, Cavalcanti JLS, Moreira DM. Alterações neuroradiológicas cerebrais na degeneração combinada de medula: relato de caso. Arq Neuro-psiquiatr. 2000;58(3):752-5.
17. Vives Corrons JL. Introduccion al estudio de la patología eritrocitaria: bases bioquímicas y fisiológicas. In: Sans-Sabrafen J, editor. Hematologia clinica. 3. ed. Madrid: Mosby; 1994.
18. Galiza Neto G, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. J Bras Patol Med Lab. 2002;39(1):51-6.
19. Stamatoyannopoulos JA. Future prospects for treatment of hemoglobinopathies. West J Med. 1992;157(6):631-6.
20. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. Blood. 2011;117(15):3945-53.
21. Nagel RL, Steinberg MH. Genetic of the  $\beta$ s gene: origins, genetic, epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: Steinberg M, editor. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. New York: Cambridge University; 2001.
22. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology: principles, procedures, correlations. 2nd ed. New York: Lippincott; 1998.
23. Astrin KH, Desnik RJ, Bishop DF. Assignment of human  $\alpha$ -aminolevulinic synthase to chromosome 3. Cytogenet Cell Genet. 1988;46:573.
24. Gidari AS, Levere RD. Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. Semin Hematol. 1977;14(2):145-68.
25. Tanner MJ. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. Curre Opin Hematol. 2002;9(2):133-9.
26. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. Blood. 2003;101(10):4180-8.
27. Morrow JS, Rimm DL, Kennedy SP. Of membrane stability and mosaics: the spectrin cytoskeleton. In: Hoffman J, Jamieson J, editors. Handbook of physiology: section 14: cell physiology. London: Oxford; 1997.
28. Grum VL, Li D, MacDonald RI, Mondragon A. Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility. Cell. 1999;98(4):523-35.
29. Chishti AH. Function of p53 and its nonerythroid homologues. Curre Opin Hematol. 1998;5(2):116-21.
30. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages: a review. Biochimie. 1998;80(2):173-95.
31. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.





No dia a dia do laboratório clínico, um hemograma com indícios de anemia é achado comum e deve ser interpretado de maneira correta por todos os profissionais envolvidos no setor de hematologia. Índices hematimétricos fora dos limites de normalidade e achados morfológicos, como hipocromia e policromatofilia, devem ser avaliados de maneira a se buscar a causa de sua presença. Hemogramas de gestantes, crianças e idosos necessitam de maior atenção devido a grande incidência de anemias nessas populações.

Primeiramente, é importante salientar que a anemia não é uma doença, mas sim um sinal objetivo da presença de uma doença. Portanto, ao se deparar com dados laboratoriais de uma anemia, a patogênese dessa condição precisa ser elucidada. Uma anemia causada por deficiência de ferro é totalmente diferente em sua fisiopatologia em relação a uma anemia hemolítica, e isso deve ser investigado por exames complementares que possam levar o clínico ao diagnóstico e tratamento correto.

O primeiro passo no diagnóstico da anemia é a detecção de sua presença, o que é um dado que necessita de precisão e exatidão dos valores fornecidos pelo laboratório. O segundo passo é a investigação da doença que está causando a anemia.

Com o aumento da precisão e reprodutibilidade da dosagem da concentração de hemoglobina pelos analisadores hematológicos automatizados, esse parâmetro é o valor que mais reflete as consequências fisiopatológicas da presença da anemia.<sup>1</sup> A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu anemia em adultos como um nível de hemoglobina < 13 g/dL em homens (hematócrito [Hct] em torno de 39%) e < 12 g/dL em mulheres (Hct em torno de 36%).<sup>1</sup> Mesmo com a aceitação pela maioria dos laboratórios destes valores, cada laboratório deve estabelecer seus próprios limites de normalidade. A correta interpretação da concentração da hemoglobina depende da idade, do sexo e de etnia do paciente, bem como de condições externas como a altitude em que o exame é realizado e por influências ambientais.<sup>2</sup>

A diferença na concentração de hemoglobina entre homens e mulheres pode ser explicada pelo efeito androgênico sobre a eritropoiese. A anemia fisiológica infantil (nível de hemoglobina menor em crianças) tem sido relacionada ao diferente comportamento metabólico dos eritrócitos durante o período de crescimento. A partir dos 70 anos (anemia senil), a diminuição da concentração da hemoglobina parece estar relacionada a alterações hormonais e menor secreção de eritropoietina renal.<sup>3</sup>

Um aspecto que deve ser levado em conta na interpretação da concentração da hemoglobina é o volume plasmático do paciente. Existem situações em que a concentração de hemoglobina pode estar elevada (hemoconcentração) ou diminuída (hemodiluição) de maneira falsa. O **Quadro 6.1** descreve as situações de hemodiluição e hemoconcentração que podem influenciar a interpretação da concentração da hemoglobina.



### QUADRO 6.1 Causas de hemoconcentração e hemodiluição

#### Hemodiluição

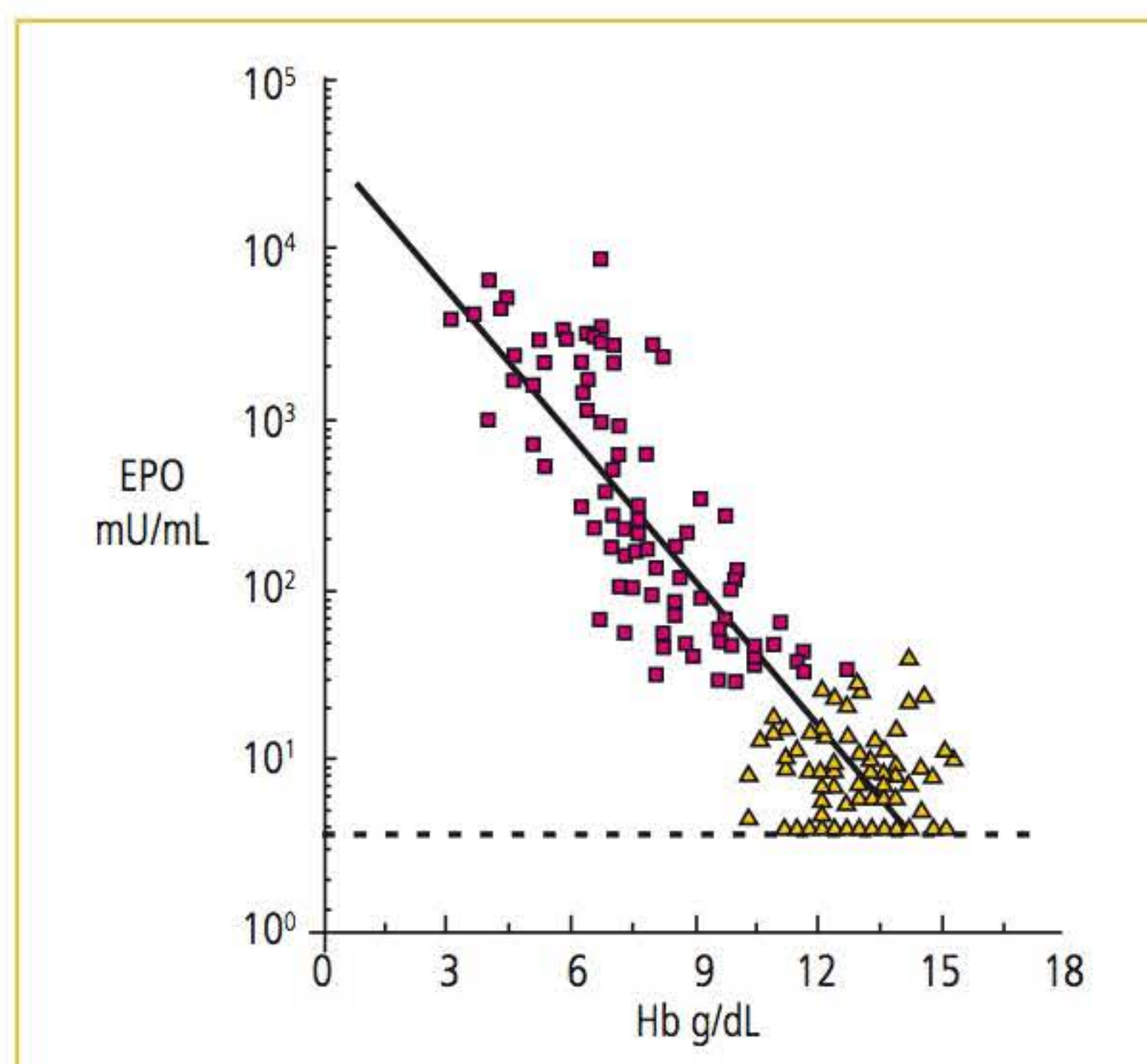
- Gravidez
- Anemias carenciais
- Insuficiência renal ou cardíaca
- Macroglobulinemia
- Hipoalbuminemia
- Hiperesplenismo
- Posição ortostática

#### Hemoconcentração

- Desidratação
- Diarreia
- Distúrbios intestinais
- Diálise peritoneal
- Acidose diabética

### MECANISMOS DE ADAPTAÇÃO DA ANEMIA

A diminuição da concentração da hemoglobina ativa a síntese de eritropoietina no rim e inicia uma série de mecanismos de compensação, principalmente em nível hematopoiético e cardiovascular. O aumento na secreção da eritropoietina (EPO) tem como principal objetivo aumentar o número de eritrócitos circulantes. A EPO aumenta o número de eritroblastos e a formação de hemoglobina, reduzindo também o número de etapas de maturação eritroide com consequente saída mais rápida de eritrócitos para circulação. Uma das consequências deste mecanismo de eritropoiese acelerada é o aumento dos reticulócitos na circulação e, consequentemente, do tamanho dos eritrócitos maduros.<sup>3</sup> A **Figura 6.1** ilustra a relação inversa entre a concentração de hemoglobina e a síntese de hemoglobina.



**FIGURA 6.1** Relação entre a produção de eritropoietina e a concentração de hemoglobina.

Outro mecanismo adaptativo é o aumento da 2,3-DPG que diminui sua afinidade pelo oxigênio, aumentando a liberação para os tecidos, melhorando o nível de oxigenação tecidual, mesmo com uma concentração menor de hemoglobina. Nos casos de anemia aguda, a redistribuição sanguínea tem como objetivo imediato garantir oxigenação adequada a órgãos vitais, predominando a vasoconstrição cutânea (palidez) e um maior débito cardíaco (taquicardia). Em casos de anemia crônica, ocorre aumento do volume plasmático para manter a volemia.

### INTERPRETAÇÃO LABORATORIAL DO ERITROGRAMA

No passado, as contagens de glóbulos e as demais determinações do hemograma eram feitas por meio de técnicas manuais, empregando câmaras de contagem, tubos graduados, centrífugas e colorímetros. A dosagem da hemoglobina, o hematócrito e a contagem de leucócitos eram as determinações mais realizadas. Das determinações relativas à série vermelha, eram calculadas as constantes corpusculares volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM). Atualmente, com a introdução dos analisadores hematológicos automatizados, essas determinações são realizadas em poucos minutos, de maneira reproduzível e mais exata.<sup>2</sup>

A correta interpretação do eritrograma depende de vários fatores que devem ser conhecidos pelos profissionais que realizam os hemogramas no laboratório clínico. Os valores de normalidade, que respeitam as características do paciente (sexo, idade, etnia, etc.), os principais mecanismos fisiopatológicos de instalação da maioria das anemias, as alterações morfológicas e os métodos que existem atualmente nos analisadores hematológicos devem ser conhecidos de forma razoável. Um exemplo disso é a interpretação do RDW (do inglês *red distribution width*), uma vez que o mesmo possui importância na classificação das anemias e pode auxiliar no diagnóstico de suas causas.

Na maioria dos laboratórios clínicos, o laudo do eritrograma dispõe das seguintes informações:

1. Contagem de eritrócitos;
2. Dosagem de hemoglobina;
3. Hematócrito;
4. Volume corpuscular médio (VCM);
5. Hemoglobina corpuscular média (HCM);



6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM);
7. Amplitude da anisocitose (RDW);
8. Alterações morfológicas.

## CONTAGEM DE ERITRÓCITOS

Tecnicamente, a contagem dos eritrócitos é realizada na maioria dos contadores hematológicos pelo método da impedância. A contagem de eritrócitos não tem valor clínico, pois não dá nenhuma informação sobre a patologia do paciente; no entanto, isso não significa que a contagem não deva ser realizada, já que ela é importante para o cálculo e para a interpretação das constantes corpusculares. A contagem automatizada dos eritrócitos é bem mais precisa e exata que a manual, e como as constantes corpusculares dependem de sua determinação, esses índices passaram a ser mais confiáveis.

## DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

A dosagem de hemoglobina é o parâmetro laboratorial que permite saber se o paciente está ou não anêmico e informa a intensidade da anemia. Uma anemia discreta é caracterizada laboratorialmente como um valor de hemoglobina variando do valor mais baixo de referência até 10 g/dL. Anemia moderada tem valor da hemoglobina entre 10 e 7 g/dL, e anemia intensa, o valor abaixo de 7 g/dL.

Para a dosagem de hemoglobina, adiciona-se um volume predeterminado de sangue total a um diluente que lisa os eritrócitos pela hipotonicidade e pela presença de um detergente lítico não iônico. A dosagem é realizada medindo-se a densidade ótica da solução da hemoglobina ou de seus derivados, geralmente em 540 nm.<sup>2</sup> O International Committee for Standardization in Haematology (ICSH) recomenda um método no qual a hemoglobina é convertida em ciano-meta-hemoglobina. Existem outros métodos que são utilizados para a dosagem da hemoglobina nos contadores hematológicos. O lisante lauril-sulfato de sódio tem sido utilizado em alguns modelos da marca Sysmex® com maior eficiência hemolítica em situações de leucocitoses e hipertrigliceridemias. Apesar do ICSH recomendar que a concentração de hemoglobina seja expressa em g/L ou mmol/L, no Brasil, esse parâmetro é fornecido em g/dL.<sup>2</sup>

## HEMATÓCRITO

Idealizado por Maxwell Wintrobe no início do século passado, o teste era chamado na rotina labo-

ratorial de macro-hematócrito, utilizando 1 mL de sangue anticoagulado, com um tempo de centrifugação de 30 minutos. A introdução do micro-hematócrito ajudou na popularização do método e tornou o teste mais acessível à maioria dos laboratórios. Originalmente, o hematócrito era o nome dado por Wintrobe ao tubo que ele idealizou para usar na medição, enquanto o volume globular era a unidade de medida. Com o passar do tempo, o termo hematócrito se difundiu como o nome do teste, que passou a ser utilizado na rotina laboratorial. O termo hematócrito equivale à fração ocupada pelos eritrócitos em uma coluna de sangue centrifugado, sendo expresso em valor percentual. Para a determinação do micro-hematócrito, utiliza-se um capilar não graduado, com dimensões definidas e, então, após uma centrifugação em alta rotação, obtém-se uma coluna de sangue separada entre eritrócitos e plasma, com uma pequena camada de leucócitos e plaquetas na interface (*buffy coat*). O hematócrito manual é um método que avalia o *status* eritroide; porém, em pacientes acompanhados de condições de hemoconcentração, o hematócrito pode estar normal ou mesmo elevado, embora a massa eritroide esteja diminuída, o que reduz sua confiabilidade como uma medida da anemia após perdas sanguíneas agudas ou transfusões sanguíneas.<sup>4</sup>

O micro-hematócrito pode ser útil mesmo em tempos de automação na hematologia. A sua combinação com a dosagem de hemoglobina pode ser uma estimativa confiável da CHCM e pode ser usado para calibração dos analisadores hematológicos. Em casos de policitemias, tem sido descrito que os hematócritos obtidos nos analisadores hematológicos não são confiáveis, tendo, então, o método manual a maior importância nesses casos.<sup>5</sup>

Nos analisadores automatizados, o hematócrito é determinado de maneira indireta, ou seja, é calculado pela inversão da fórmula do VCM manual. O VCM proposto por Wintrobe dividia o valor obtido no hematócrito manual pelo número de eritrócitos. Dessa maneira, a fórmula para a obtenção do valor do hematócrito na automação é:

$$\text{HCT} = \frac{\text{VCM} \times \text{eritrócitos}}{10}$$

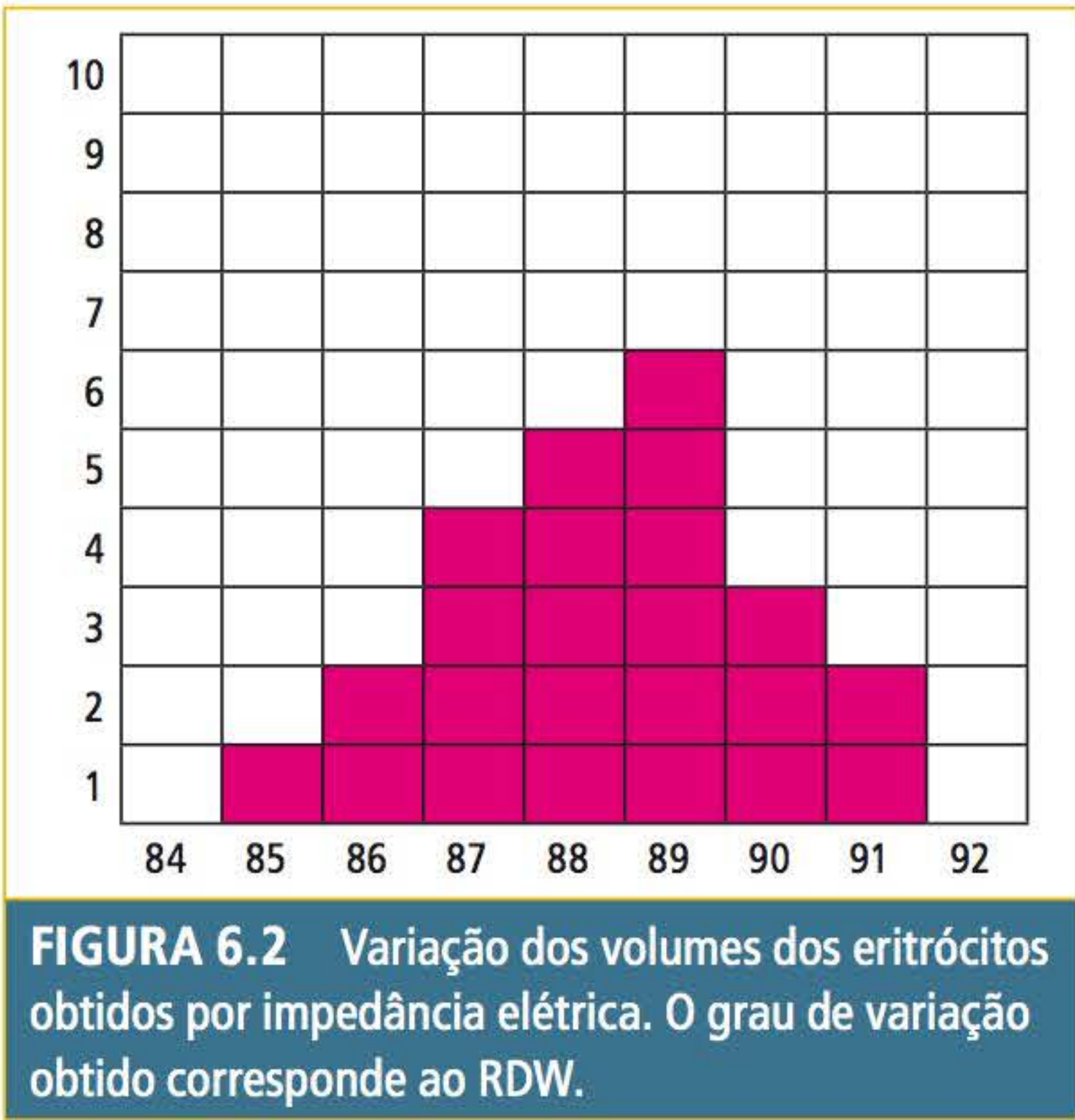
Pelas várias fontes de erro que o micro-hematócrito apresenta, o valor indireto do hematócrito é mais confiável em relação ao método manual. As



diferenças entre o micro-hematócrito e o hematócrito automatizado podem variar entre 1 e 3%.

### VCM

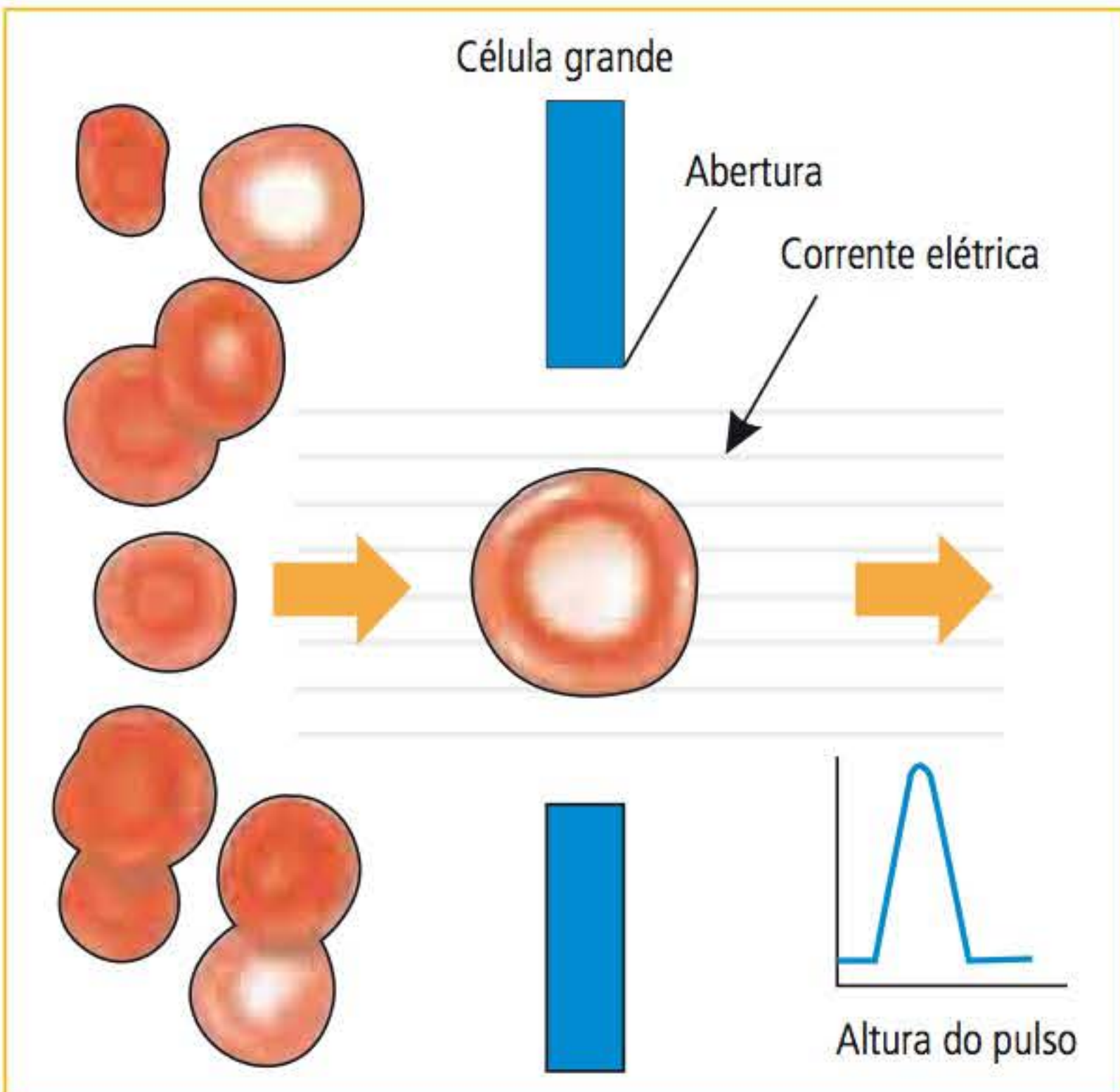
O VCM obtido nos contadores hematológicos é parâmetro fundamental para a classificação das anemias na busca da sua possível causa. O VCM é uma medida direta do tamanho da população eritrocitária, podendo ser obtido pela impedância elétrica ou pela dispersão a *laser*. Os eritrócitos são contados e medidos a partir dos pulsos elétricos que geram: a somatória de todos os volumes dividida pelo número de eritrócitos corresponde ao VCM. A **Figura 6.2** exemplifica a somatória de pulsos elétricos que são correspondentes a valores específicos em fentolitros. É importante notar a variação dos volumes celulares que corresponderão ao RDW, ou seja, a variação do tamanho dos eritrócitos.



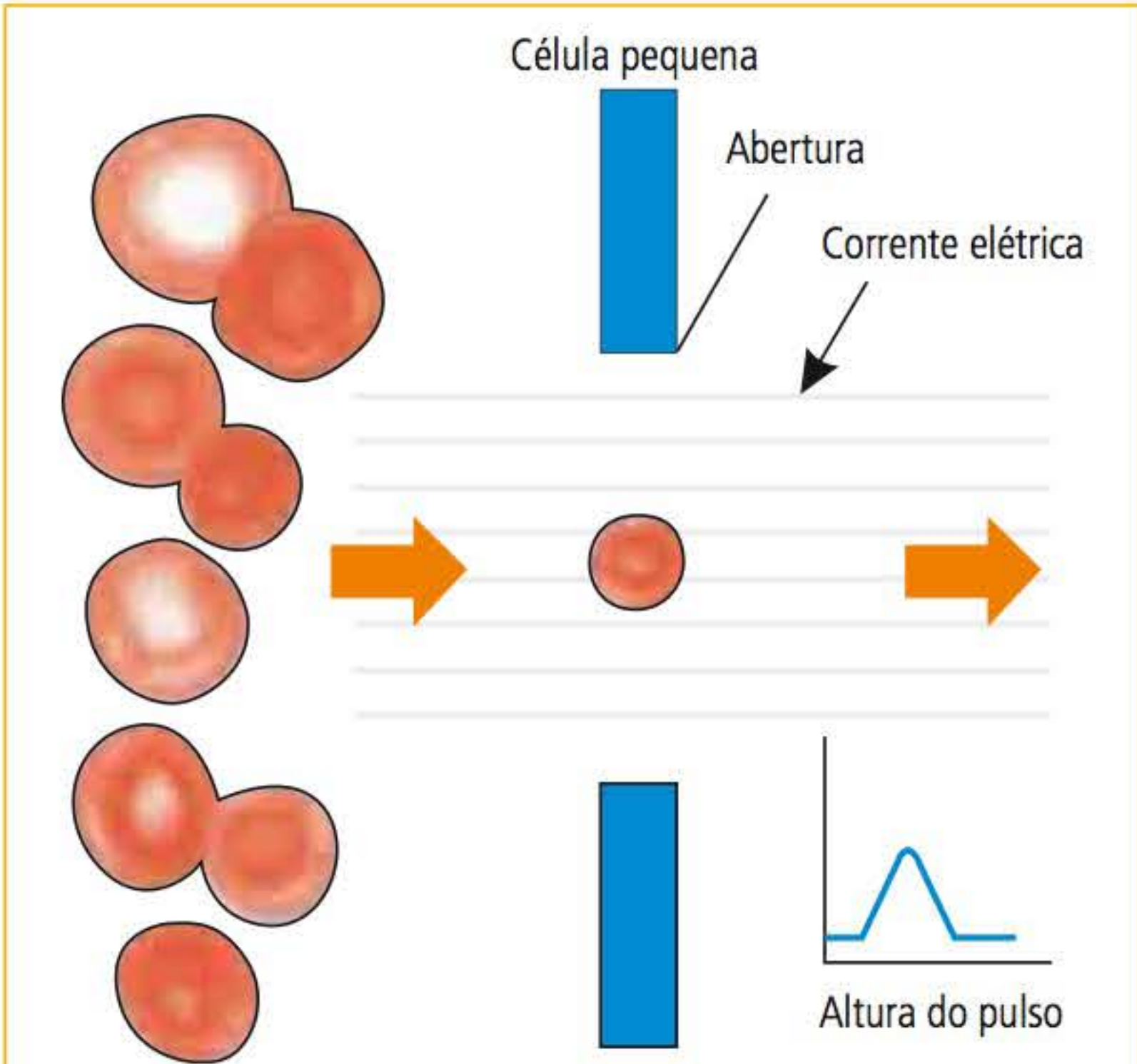
**FIGURA 6.2** Variação dos volumes dos eritrócitos obtidos por impedância elétrica. O grau de variação obtido corresponde ao RDW.

As **Figuras 6.3 e 6.4** ilustram como os equipamentos que utilizam a impedância realizam a determinação do VCM em eritrócitos pequenos e grandes. Com o predomínio de pulsos elétricos que correspondem ao volume dos eritrócitos, são gerados histogramas de células. A **Figura 6.5** ilustra um histograma de eritrograma normal com VCM de 88 fentolitros (A). Populações microcíticas deslocam o histograma para o lado esquerdo (B), enquanto eritrócitos macrócitos formam histograma deslocado para a direita (C).

Um fator pouco conhecido entre os profissionais que realizam o eritrograma é a influência que a análise dos eritrócitos por impedância possui sobre os outros parâmetros do eritrograma. Nos



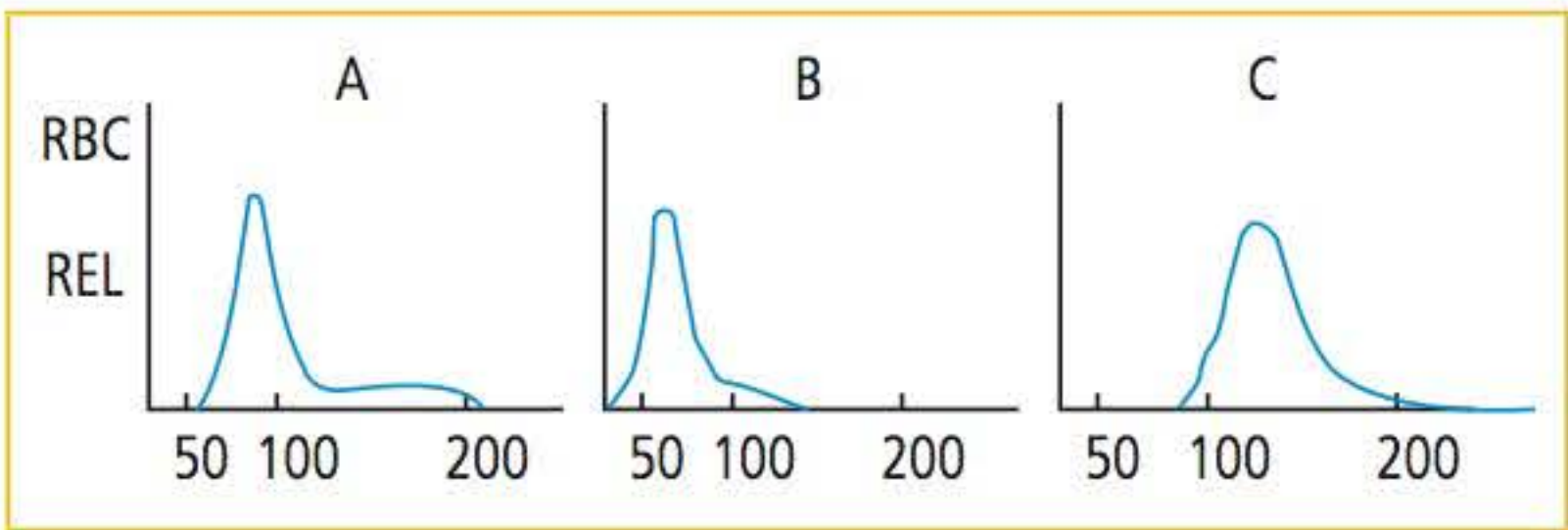
**FIGURA 6.3** Determinação do tamanho de eritrócito grande (macrócito) em analisador hematológico que utiliza a impedância elétrica como método de contagem. O tamanho aumentado da célula é percebido pela altura do pulso elétrico.



**FIGURA 6.4** Determinação do tamanho do eritrócito pequeno (micrócito) em analisador hematológico que utiliza a impedância elétrica como método de contagem. O tamanho diminuído da célula é percebido pela altura do pulso elétrico.

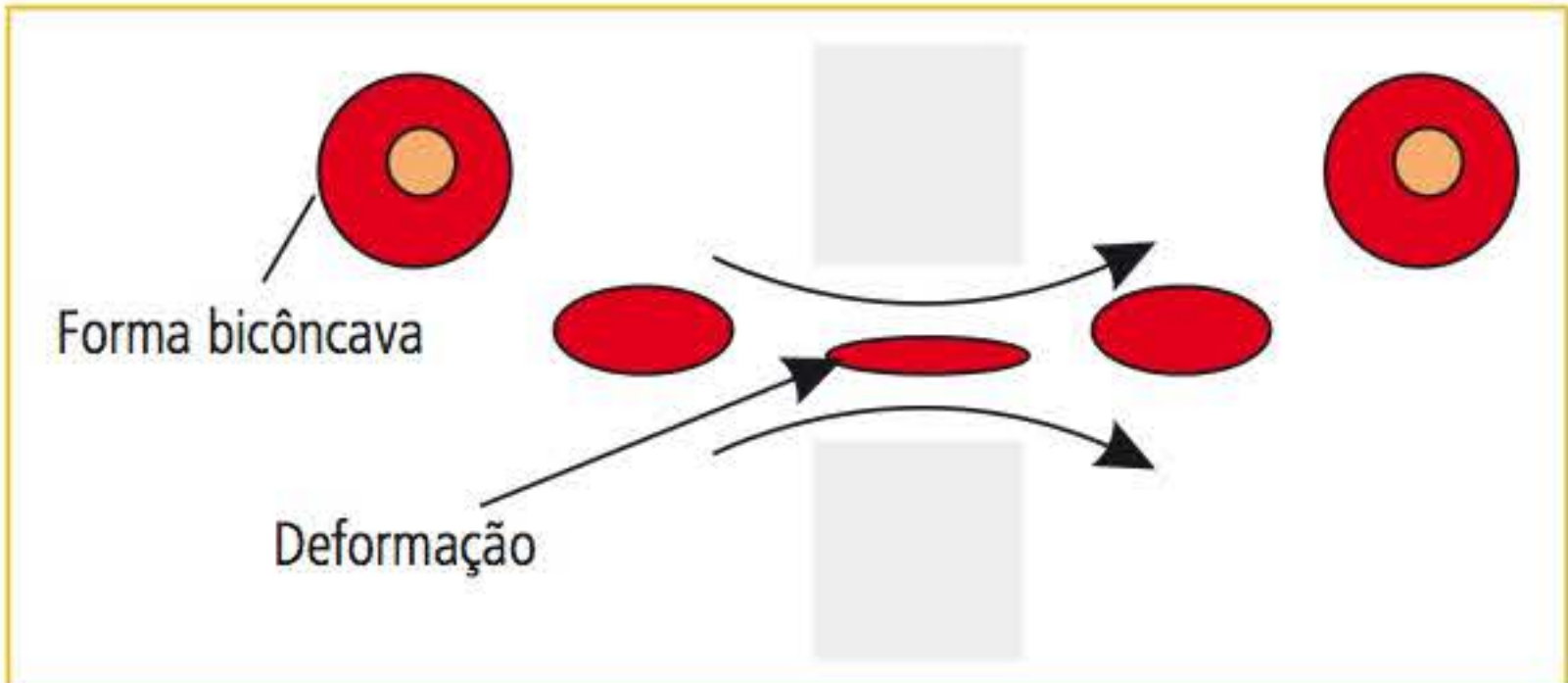
contadores que utilizam a impedância elétrica como método de contagem, existem algumas inexactidões inerentes ao método, as quais aumentam quando as células são anormais. O pulso elétrico produzido por uma célula pode ser considerado como uma sombra elétrica da célula, que é pro-





**FIGURA 6.5** Histogramas de distribuição do tamanho dos eritrócitos em condições de normocitose (A), microcitose (B) e macrocitose (C).

porcional ao seu tamanho e forma. Dentro da zona de contagem do aparelho, um eritrócito normal passa pela abertura em forma fusiforme ou charuto, o que origina uma sombra elétrica próxima ao seu tamanho real. Isso significa que o valor do VCM de um eritrograma não reflete exatamente o tamanho fisiológico do eritrócito, mas sim um tamanho próximo do real. Essa deformabilidade é dependente da concentração da hemoglobina, em que eritrócitos hipocrômicos tendem a se deformar mais do que um eritrócito hipercrômico. Essa limitação inerente da impedância é denominada por alguns autores como “efeito forma” (Figura 6.6). De forma geral, o VCM normal varia entre 80 a 100 fL.



**FIGURA 6.6** Deformação que o eritrócito sofre ao passar pela zona de contagem de um analisador hematológico que utiliza a impedância como método de contagem de eritrócitos em forma de charuto (efeito forma).

**HC**

O HCM indica, na média, qual o peso de hemoglobina dentro dos eritrócitos, sendo um valor absoluto que é calculado a partir da fórmula:

$$HCM = Hb \text{ (g/dL)} \times 10/\text{Eritrócitos}$$

O HCM sofre influência direta do VCM e da CHCM, ou seja, células grandes (VCM alto) irão influenciar a HCM para cima, refletindo o peso aumentado dessa célula, enquanto células pequenas (VCM baixo) diminuem a HCM pelo baixo peso da célula. Acredita-se que, na anemia ferro-

priva, a HCM caia antes que a CHCM, indicando a hipocromia; o que não é verdadeiro, pois esta diminuição deve-se, principalmente, à diminuição do VCM (menor peso). Dessa forma, a HCM é um parâmetro que deve ser analisado dentro do contexto do hemograma e não de forma isolada. As Tabelas 6.1 e 6.2 demonstram duas situações que ilustram o comportamento dependente da HCM em relação ao VCM, o que limita sua utilização como parâmetro de hipocromia ou hipercromia.

**TABELA 6.1** Eritrograma que indica anemia macrocítica intensa. Elevação da HCM pelo VCM alto e CHCM normal, portanto, sem hipercromia

Eritrócitos	2,32
Hemoglobina	8,2
Hematócrito	24,7
VCM	103,4
HCM	35,3
CHCM	34,2
RDW	21,3

**TABELA 6.2** Eritrograma indicativo de talassemia heterozigota com discreta diminuição da hemoglobina, HCM baixo e CHCM próximo à normalidade

Eritrócitos	5,37
Hemoglobina	11,3
Hematócrito	35,7
VCM	66,5
HCM	21,0
CHCM	31,9
RDW	14,7

**CHCM**

A CHCM na automação é baseada na fórmula que utiliza o VCM e a contagem de eritrócitos para a sua obtenção:

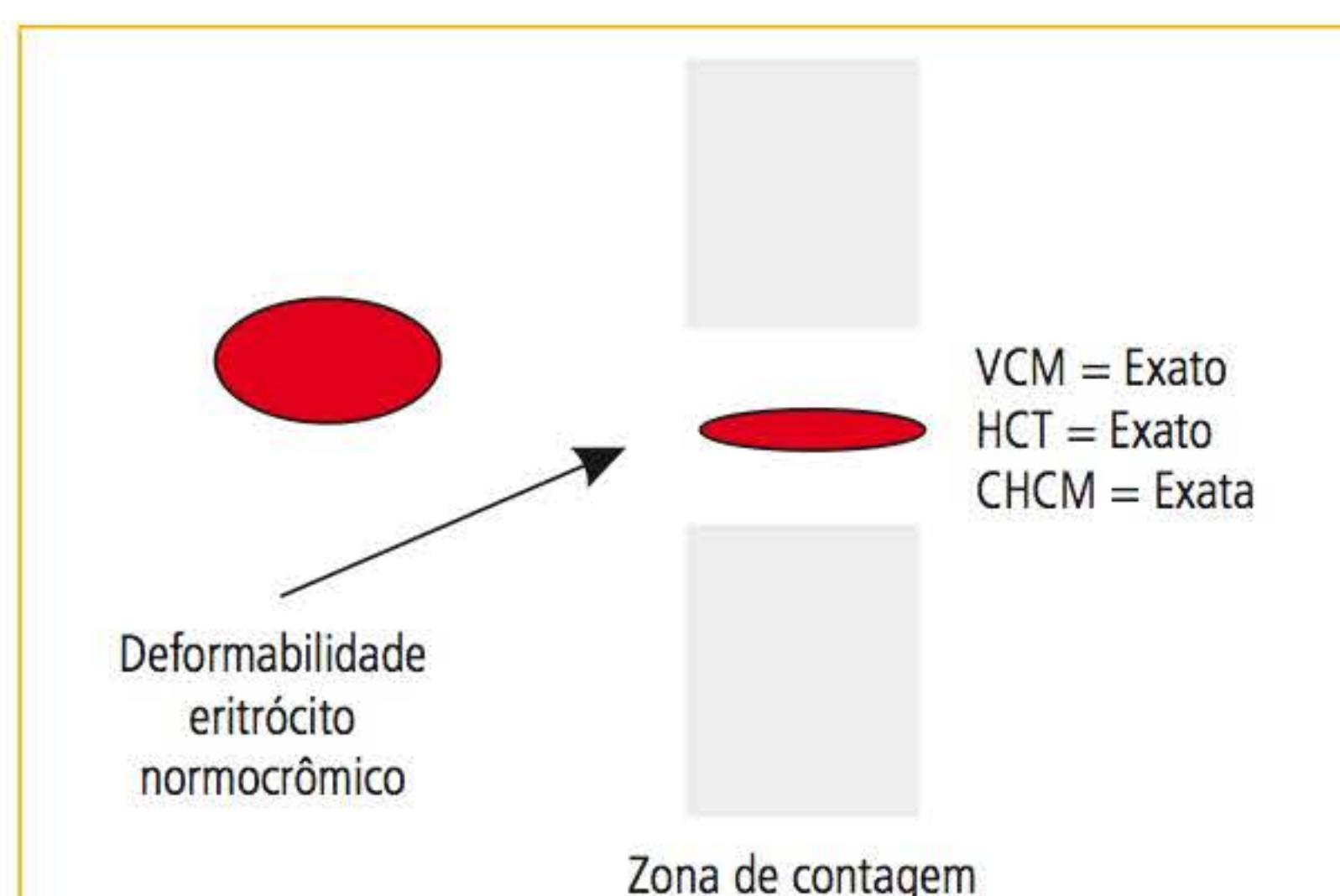
$$CHCM = Hb \times 100/VCM \times \text{Erit}/10$$

Teoricamente, é o parâmetro para avaliação da hipocromia e hipercromia. A elevação da CHCM é relacionada à presença de esferócitos, drepanócitos, eritrócitos desidratados, fragmentação eritrocitária e ao excesso de anticoagulante na amostra. A hipocromia revela-se na diminuição da CHCM, e seu grau de intensidade pode ser relacionado ao valor desse parâmetro. A CHCM é um parâmetro



muitas vezes negligenciado na maioria dos laboratórios, e isso pode ser explicado pelas influências que esse parâmetro sofre, principalmente quando determinado por impedância elétrica.

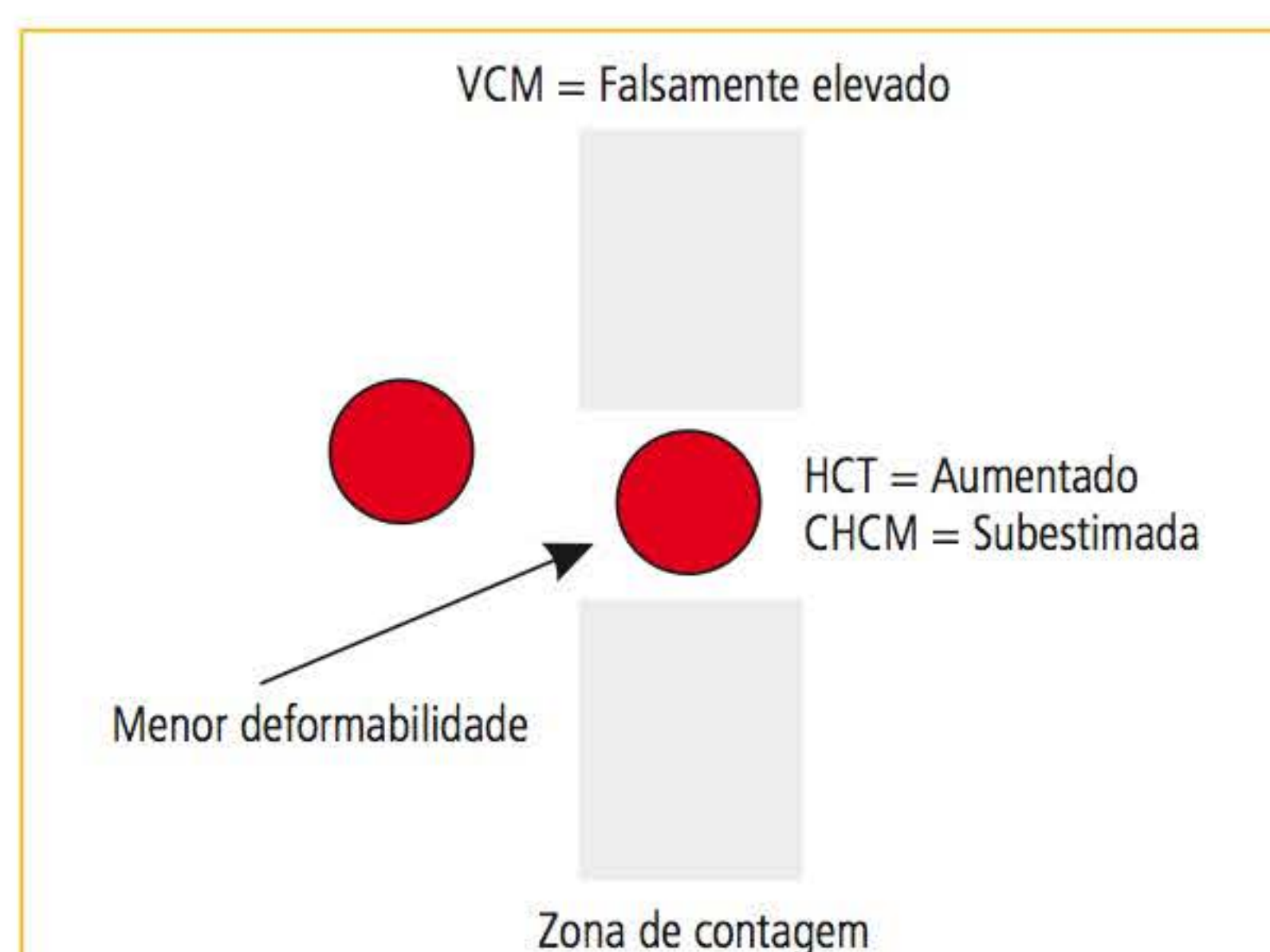
Eritrócitos com concentração de hemoglobina adequada (eritrograma normal) sofrem deformações na zona de contagem em equipamentos por impedância. Porém, essa deformação não é suficiente para alterar a interpretação do VCM e da CHCM (efeito forma) (**Figura 6.7**). Células normocrômicas, que se deformam apropriadamente, geram VCMs exatos que, por sua vez, geram hematócritos exatos e, por fim, CHCMs com exatidão, ou seja, com valores os mais próximos possíveis do valor verdadeiro.



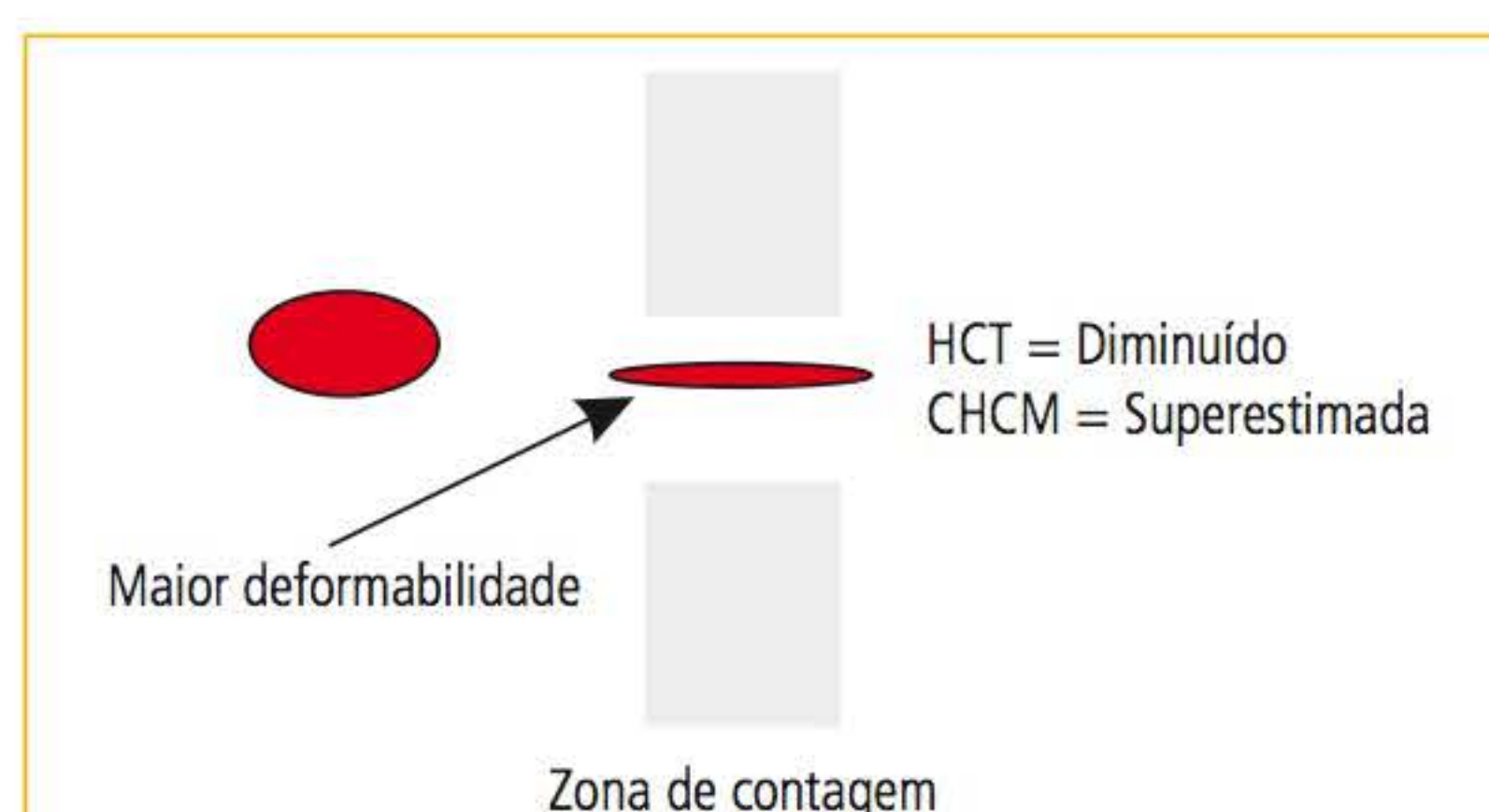
**FIGURA 6.7** Deformação sofrida pelo eritrócito normocrômico e normocrômico. Apesar da deformabilidade, são gerados parâmetros exatos e próximos aos verdadeiros.

A influência dessa deformação é percebida nas situações de hipocromia e hipercromia. Células hipercrômicas, com baixa deformabilidade, fazem com que o VCM seja superestimado, ou seja, aumente. Com isso, teremos aumento espúrio do hematócrito e diminuição espúria da CHCM. Diminuição espúria não significa CHCM diminuída, abaixo dos valores de referência, mas que a CHCM está subestimada em relação ao valor real. No caso de esferócitos, a CHCM pode até estar acima dos valores de referência, mas, mesmo assim, estará subestimada devido à limitação da impedância em relação à deformabilidade das células (**Figura 6.8**).

Na hipocromia, o grau de deformação é maior, e a sombra elétrica fica menos evidente, o que resulta em um VCM menor do que o real, diminuindo o hematócrito e elevando falsamente a CHCM, que deveria ser mais baixa (**Figura 6.9**). Essas variações para cima e para baixo fazem com que a CHCM seja um parâmetro homogêneo em rotinas laboratoriais, ou seja, quando deveria elevar-se,



**FIGURA 6.8** Deformação sofrida pelo eritrócito hipercrômico. A menor deformabilidade gera uma superestimação do VCM com aumento espúrio do hematócrito e diminuição da CHCM.



**FIGURA 6.9** Deformação pelo eritrócito hipocrômico. O VCM é menor do que o real, o hematócrito tem elevação espúria e a CHCM é superestimada.

ela fica normal e, quando deveria diminuir, ela permanece dentro dos limites de normalidade. O não conhecimento desses fatores trouxe descrédito à interpretação da CHCM na sua utilização como parâmetro de hipocromia e hipercromia.

Os fabricantes de equipamentos, sabendo dessas limitações, realizaram esforços técnicos para diminuir essas variações que interferem na interpretação do eritrograma. Uma das formas encontradas foi melhorar a centralização das células na zona de contagem. Esse mecanismo é conhecido como fluxo hidrodinâmico, que reconhecidamente diminui o “efeito forma”. Portanto, para o profissional do setor de hematologia, é fundamental o conhecimento de como seu equipamento realiza as suas contagens. Equipamentos que utilizam a impedância elétrica sem o fluxo hidrodinâmico possuem sérias limitações para a utilização de um parâmetro de hipocromia ou hipercromia. Por outro lado, equipamentos com fluxo hidrodinâmico podem trazer maior con-

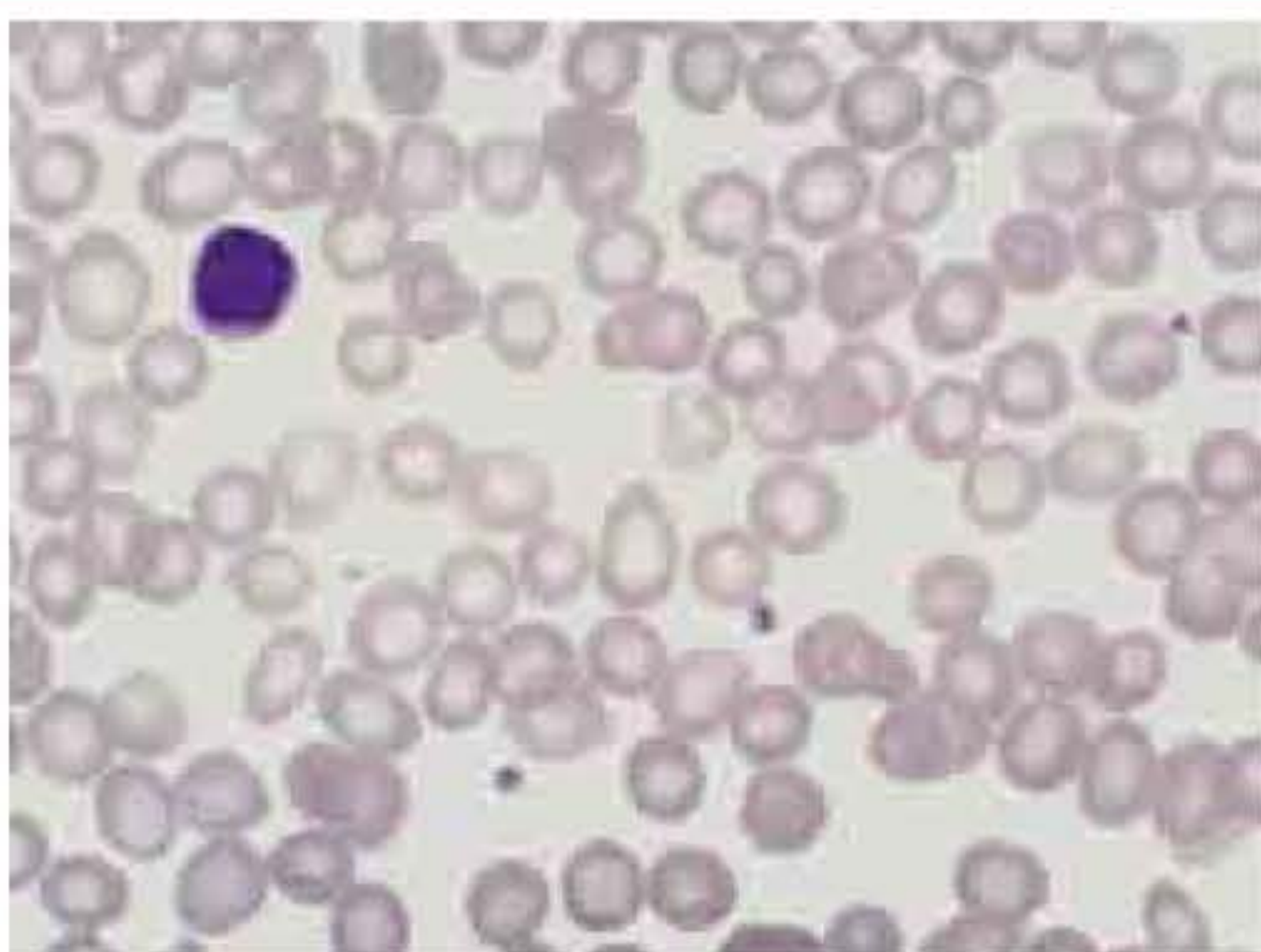


fiabilidade na interpretação da CHCM como parâmetro de cor para o eritrócito.

Uma questão que fica em aberto: como analisar a hipocromia ou a hipercromia em eritogramas obtidos por impedância sem fluxo hidrodinâmico? Nesses casos, a análise morfológica passa a ser a única ferramenta para o estudo dessas condições, o que aumenta a importância de profissional bem preparado na rotina laboratorial.

A **Figura 6.10** ilustra a extensão sanguínea de um paciente com anemia ferropriva instalada. Dados do eritrograma obtidos em analisador hematológico Coulter T-890, que utiliza como método de contagem celular a impedância, sem o fluxo hidrodinâmico, são os seguintes:

- Eritrócitos = 4,68
- Hemoglobina = 9,0
- Hematócrito = 28,0
- VCM = 59,8
- HCM = 19,2
- CHCM = 32,1

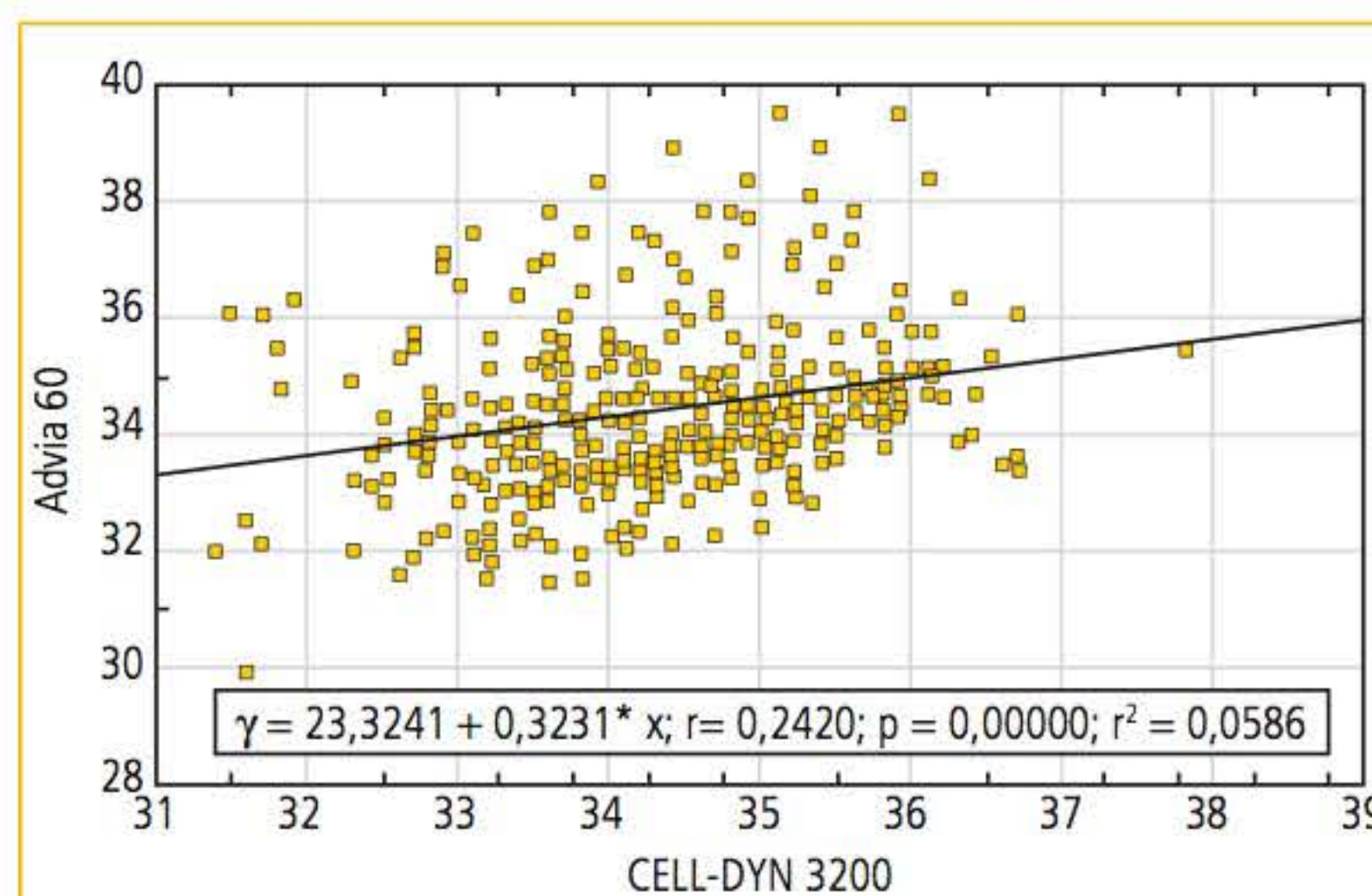


**FIGURA 6.10** Extensão sanguínea de paciente com anemia ferropriva instalada (fase 3) com hipocromia evidente. A CHCM – 32,1% foi obtida de equipamento Coulter T 890. Nesta situação, a análise da extensão sanguínea é a forma mais correta para avaliar a hipocromia.

Observa-se o valor da CHCM ainda normal, mas, na extensão sanguínea, a hipocromia já é evidente. Nesta situação, a hipocromia deve ser relatada com base na análise morfológica.

Equipamentos que utilizam tecnologia *laser*, em geral, possuem o foco hidrodinâmico, o que praticamente elimina o efeito forma, ou seja, a CHCM é confiável e possui sensibilidade e especificidade para condições de hipocromia e hipercromia. Alguns artigos comprovam essas diferenças de comportamento da CHCM em equipamentos que realizam a contagem sem e com o foco hidrodinâmico.

Alguns estudos exploraram de maneira prática essas situações. Comparando o analisador Coulter® STKS (sem fluxo) e o equipamento Sysmex® 2100 – D (com fluxo), a correlação da CHCM foi pequena ( $r = 0,446$ ), o que reflete grandes diferenças desse parâmetro nestes equipamentos.<sup>6</sup> Analogamente, comportamento semelhante foi observado quando comparados os equipamentos Cell-Dyn® 3200 (com fluxo hidrodinâmico) e o Advia® 60 (sem fluxo hidrodinâmico)<sup>7</sup> (**Figura 6.11**).



**FIGURA 6.11** Correlação da CHCM entre os equipamentos CELL-DYN 3200 e Advia 60.

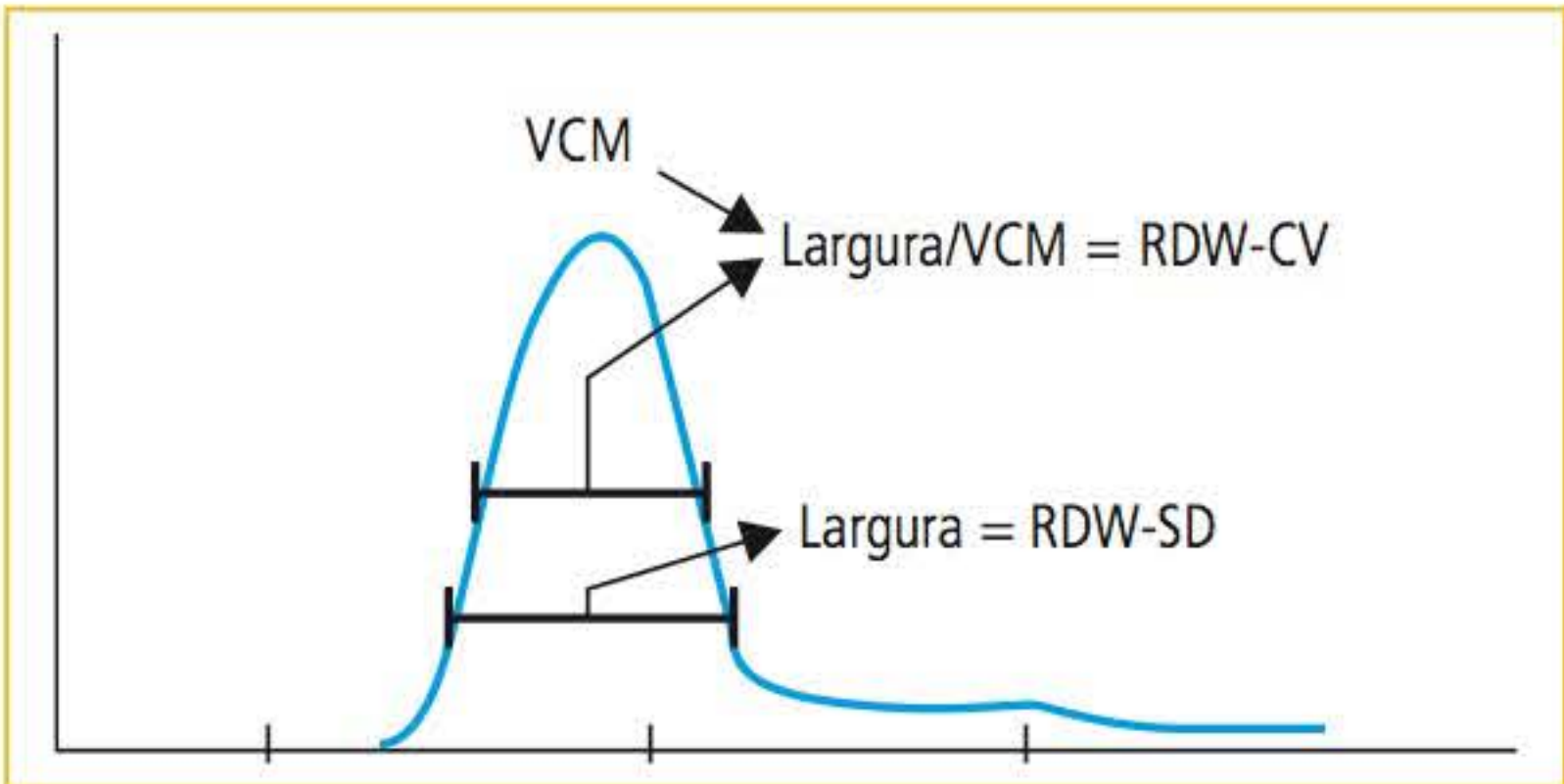
Em resumo, o parâmetro de cor que deve ser analisado no eritrograma é a CHCM; porém, suas limitações e forma de obtenção devem ser conhecidas. A HCM é um parâmetro que deve ser interpretado dentro de um contexto geral do eritrograma, lembrando-se sempre da influência que o VCM possui sobre esse parâmetro.

#### RDW

Os analisadores hematológicos calculam as variações de tamanho da população eritrocitária, índice chamado de RDW. A introdução do RDW na rotina permitiu uma nova maneira de classificação dos distúrbios dos eritrócitos, quando esse índice é avaliado em conjunto com o VCM. Já na década de 1980, existiam protocolos de classificação das anemias, como o proposto por Bessman (**Quadro 6.3**). Alguns equipamentos hematológicos liberam dois valores em relação ao RDW. O RDW-CV (**Figura 6.12**) é a relação da curva de distribuição com um desvio-padrão, dividida pelo VCM; já o RDW-SD é simplesmente a medida da largura da curva de distribuição ao nível da frequência de 20%. O aumento do RDW pode ser o primeiro indício de um distúrbio na eritropoiese, podendo ser devido ao aparecimento de células microcíticas ou macrocíticas ou,



ainda, à mistura de duas populações de eritrócitos com tamanhos diferentes. A interpretação do RDW se faz pela análise dos histogramas de distribuição dos tamanhos dos eritrócitos.



**FIGURA 6.12** Diferenças entre o RDW-CV e o RDW-SD na sua forma de obtenção.

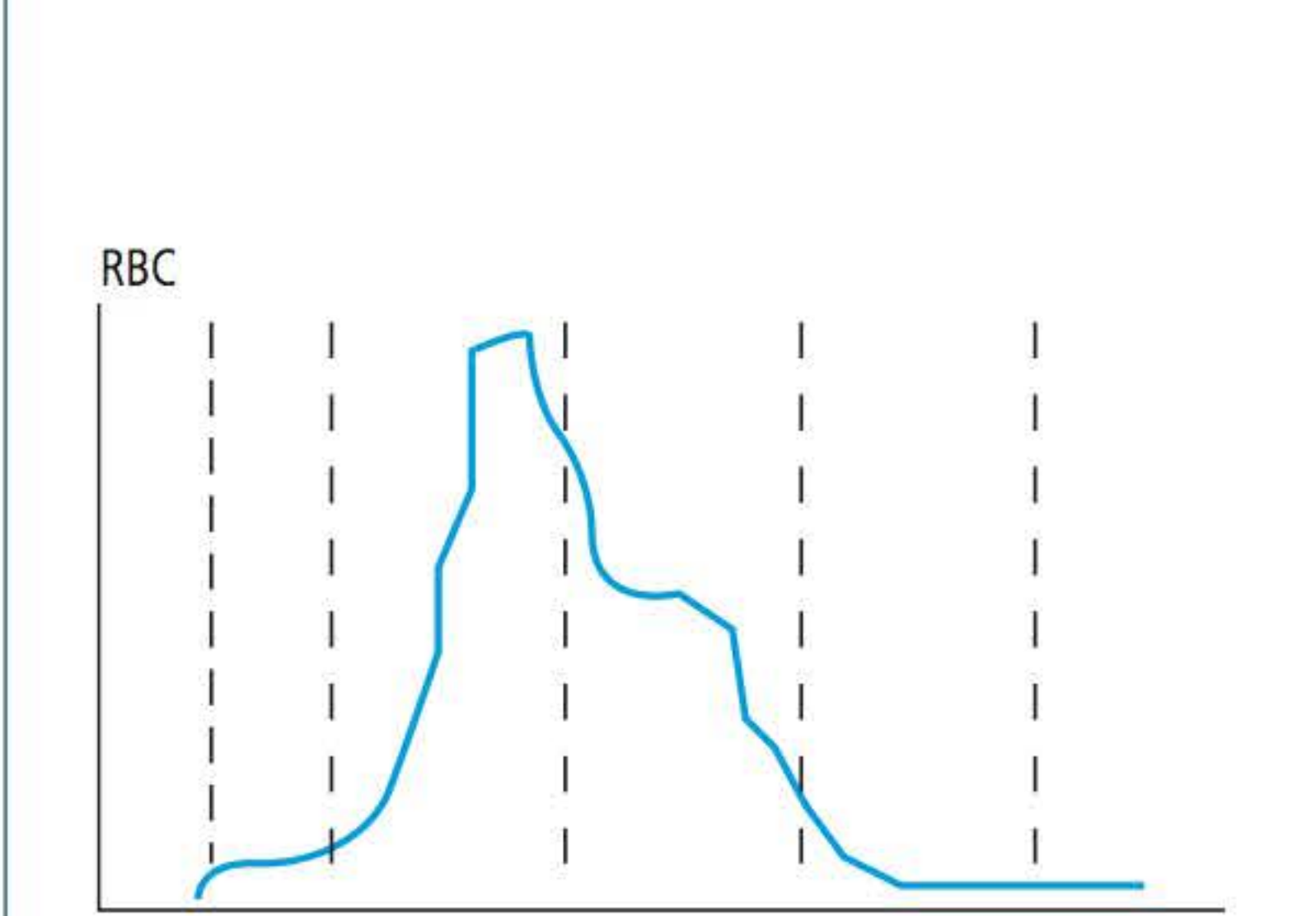
**IMPORTÂNCIA DA INTERPRETAÇÃO DOS HISTOGRAMAS DE ERITRÓCITOS**

Os histogramas são importantes para que o analista tenha uma visão da distribuição de todas as células contadas pelo analisador hematológico. A correta análise dos histogramas pode sugerir determinadas situações que, antes do advento da automação, eram impensáveis. A presença de reticulócitos, fragmentação eritrocitária, mistura de populações eritrocitárias e a indicação da presença de drepanócitos podem ser previstas pelos histogramas celulares. Nos Quadros 6.2 a 6.4 são apresentados alguns casos que exemplificam a importância da análise dos histogramas de células em equipamentos automatizados.

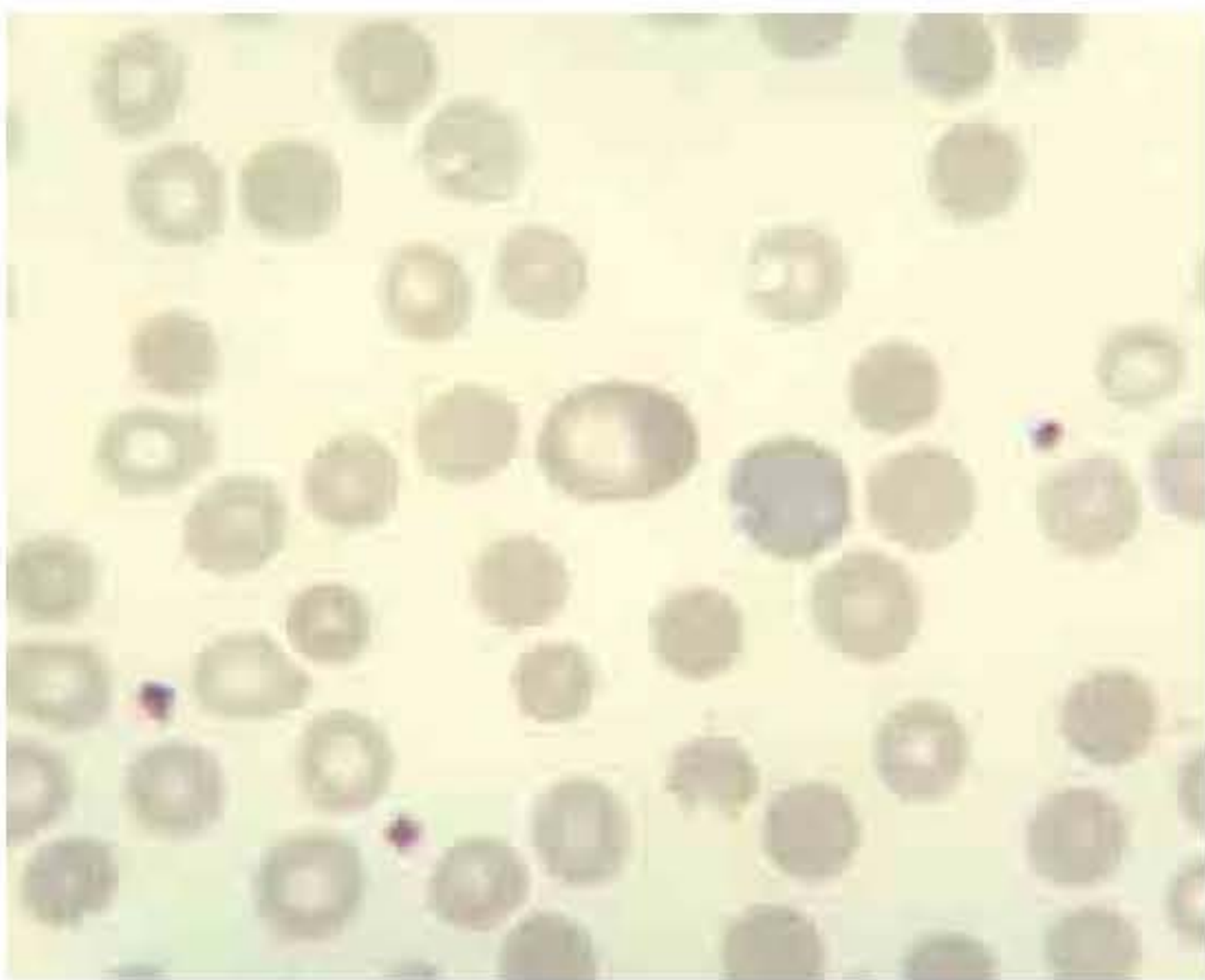
**QUADRO 6.2 Exemplo 1 – Presença de reticulócitos**

Eritrócitos	1,86
Hemoglobina	6,5
Hematócrito	19,0
VCM	102,2
HCM	34,9
CHCM	34,2
RDW	21,1

De acordo com os dados apresentados, o paciente apresenta uma anemia intensa, com VCM alto e RDW acima do valor de referência. Uma anemia macrocítica e normocrômica, com população eritroide de tamanho heterogêneo. Percebe-se no histograma a grande variação de tamanho da população eritroide, com deslocamento para a direita, o que indica a presença de eritrócitos grandes. Dessa forma, duas principais causas devem ser pesquisadas: achados morfológicos compatíveis com (1) anemia de caráter carencial, principalmente ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> e (2) distúrbios hemolíticos. No caso em questão, foi verificada intensa policromatofilia, comprovando que o desvio à direita do gráfico se deu pela presença de reticulócitos (Figuras 6.13 e 6.14).



**FIGURA 6.13** Deslocamento do histograma para a direita, que sugere a presença de reticulócitos. A pesquisa da policromatofilia na extensão é conduzida a ser realizada. Histograma obtido pelo analisador Sysmex® 2100-XE.



**FIGURA 6.14** Extensão sanguínea confirmando a presença da policromatofilia (como indicado no histograma), além de esferócitos, o que indica um processo hemolítico.



QUADRO 6.3 Exemplo 2 – Presença de drepanócitos

Eritrócitos	2,05
Hemoglobina	7,0
Hematócrito	23,7
VCM	116
HCM	34,4
CHCM	29,6
RDW	22,1

Anemia intensa, macrocítica e hipocrômica e RDW alto. A observação do histograma reflete a distribuição de células muito pequenas (à esquerda do gráfico da Figura 6.15) e um desvio da curva para a direita. O pico à esquerda é compatível com fragmentos de eritrócitos (possivelmente drepanócitos), enquanto a distribuição de células mais à direita pode indicar a presença de reticulócitos. O quadro descrito acima refere-se a um paciente portador de anemia falciforme.

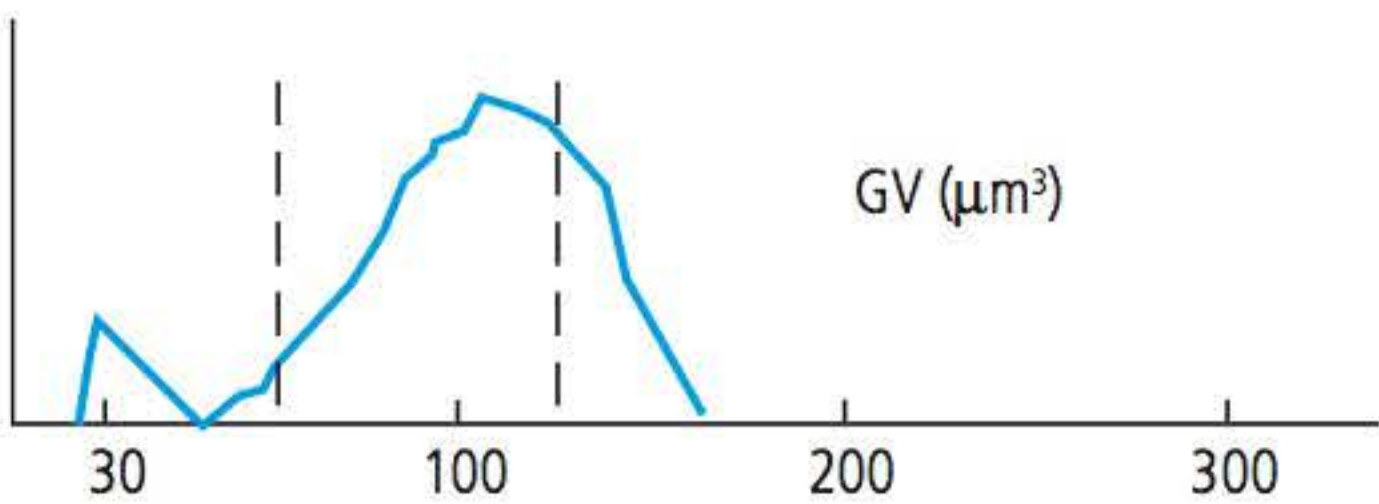


FIGURA 6.15 Presença de fragmentos de eritrócitos que são compatíveis com drepanócitos (presença de células abaixo de 50fL). Histograma obtido de equipamento Pentra 120 – Horiba®.

QUADRO 6.4 Exemplo 3 – Presença de dupla população eritrocitária

A mistura de populações normais e patológicas pode ser visualizada nos histogramas de distribuição celular. Anemias em tratamento e períodos pós-transfusionais são alguns exemplos de condições em que a dupla população de eritrócitos pode ser observada. O tratamento das anemias carenciais (ferro, ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>) geralmente apresenta populações de tamanho muito variado; nesses casos, dependendo da sensibilidade do equipamento hematológico, o valor do RDW chega a não ser liberado. A Figura 6.16 ilustra o tratamento de uma anemia ferropriva (histograma com desvio à esquerda), antes e depois do tratamento com gráfico apresentando a recuperação dos eritrócitos após o início da terapia, provavelmente em fase final de tratamento (maior quantidade de eritrócitos à direita do gráfico).

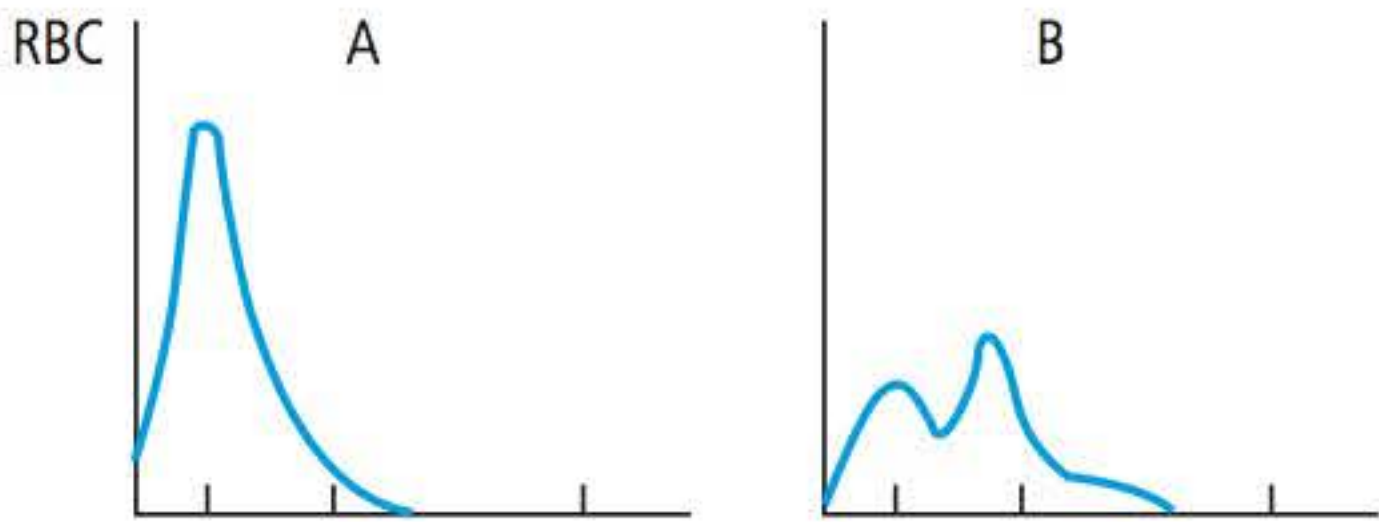


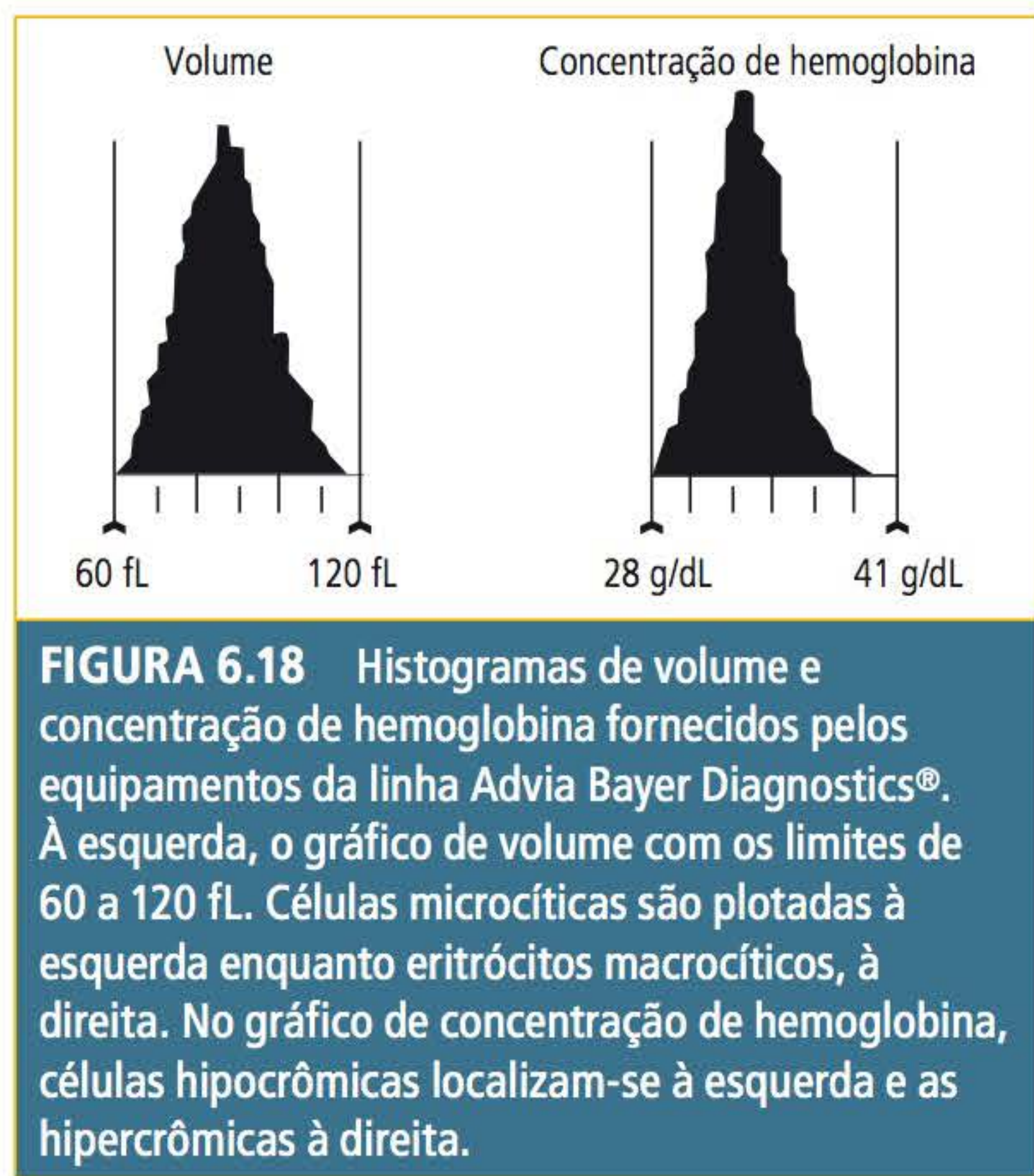
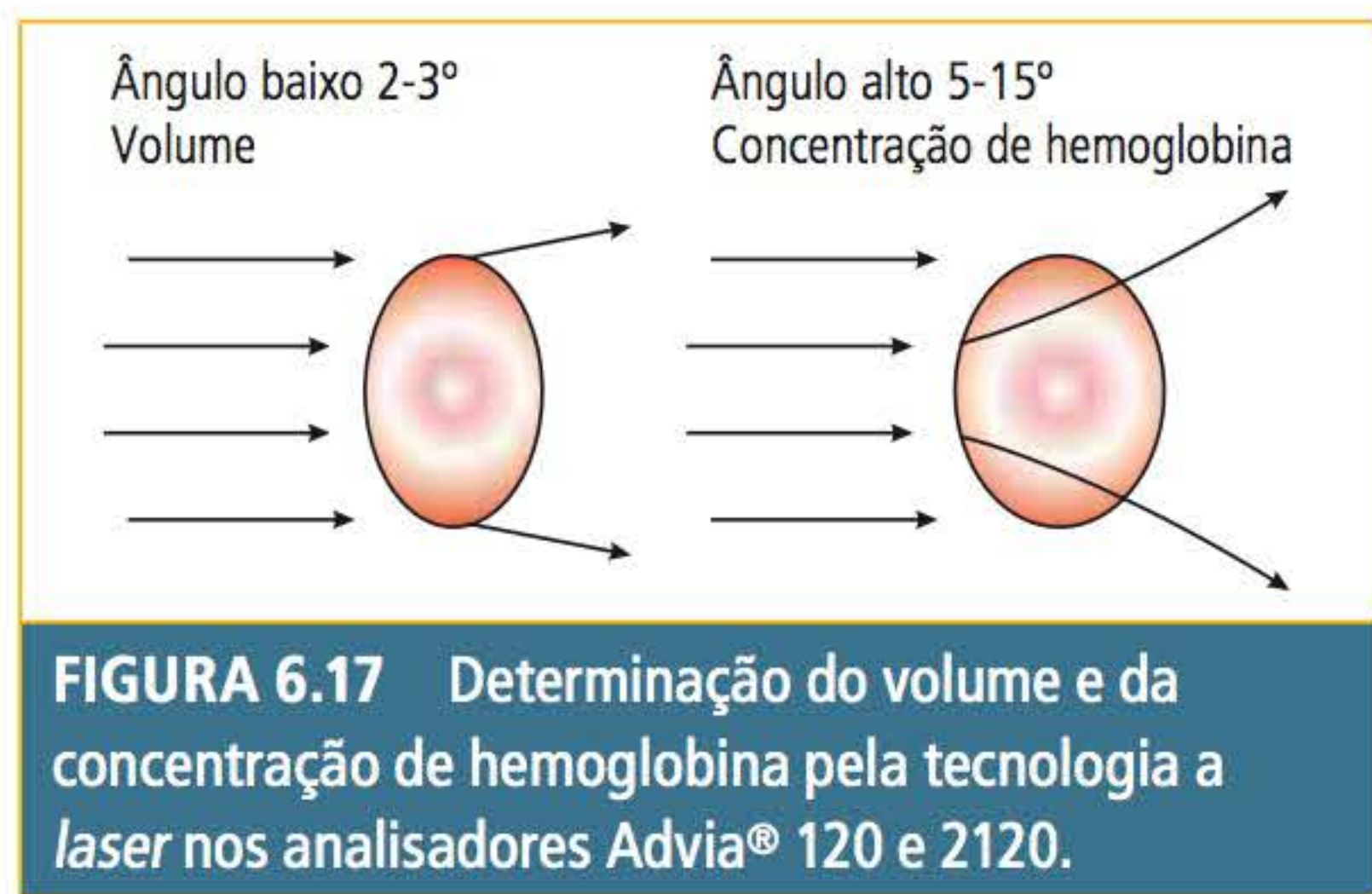
FIGURA 6.16 Histogramas de eritrócitos. (A) Anemia microcítica. (B) Dupla população eritróide.

HISTOGRAMAS DE CÉLULAS –  
TECNOLOGIA LASER

O eritrograma também pode ser realizado por dispersão a *laser*. A Bayer Diagnostics<sup>\*</sup> foi o primeiro fabricante a produzir equipamentos que realizam a análise dos eritrócitos por dispersão a *laser*. Um dos grandes avanços na análise dos eritrócitos por essa tecnologia foi a esferotização, um modo de conversão isovolumétrica que transforma os eritrócitos em esferas que são analisadas de forma independente a sua forma.<sup>2</sup> O fluxo hidrodinâmico, em

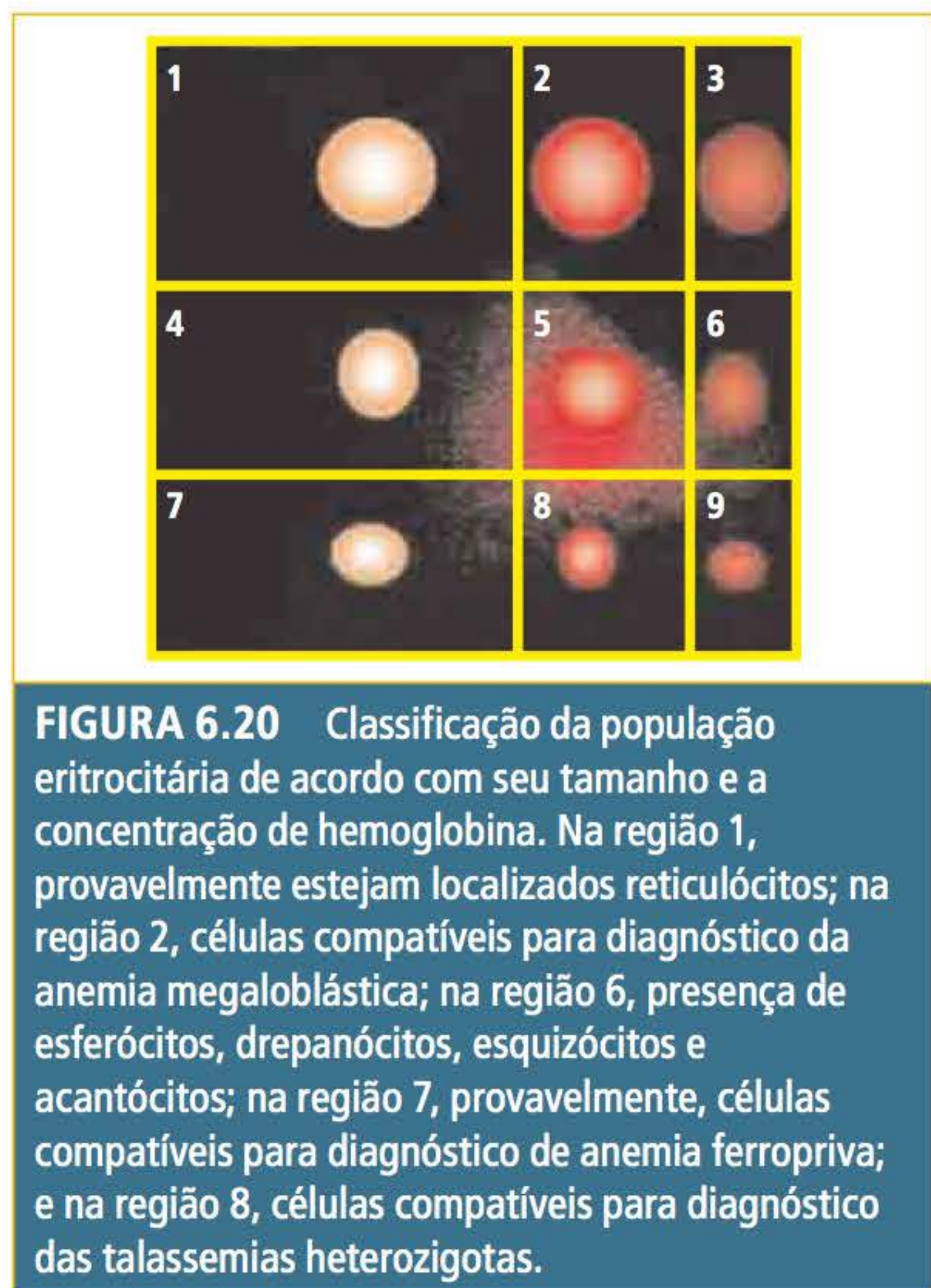
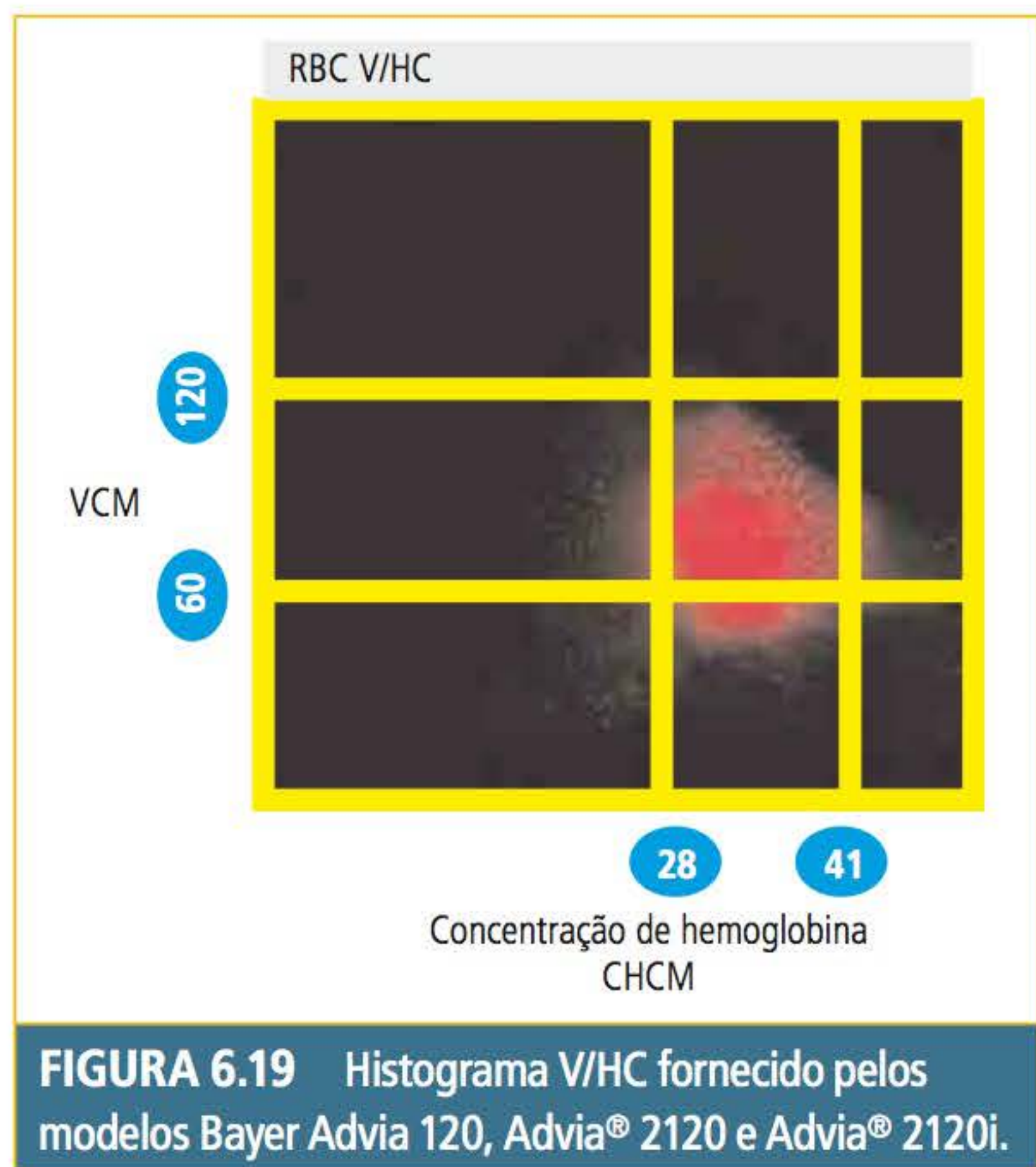
conjunto da esferotização, apresenta melhor *performance* das constantes corpusculares, principalmente a CHCM. O eritrócito é medido em dois ângulos (baixo e alto), um para a determinação da concentração de hemoglobina (alto) e outro relacionado ao tamanho do eritrócito (baixo) (Figura 6.17). São gerados dois histogramas de acordo com esses dois ângulos de análise celular (Figura 6.18); dessa forma, a comparação do tamanho e da concentração de hemoglobina permite a formação de histogramas de células mais completos, que podem ter grande utilidade no diagnóstico das anemias.





No histograma, V/HC fornecido por esses equipamentos a concentração de hemoglobina é plotado no eixo x e o tamanho dos eritrócitos ao longo do eixo y. No eixo x, a concentração normal de hemoglobina varia entre 28 e 41 g/dL (**Figura 6.19**). Células com concentração de hemoglobina menor que 28 g/dL são classificadas como hipocrômicas, enquanto concentrações maiores que 41 g/dL são consideradas hiperocrômicas. No eixo y, o volume normal dos eritrócitos varia entre 60 e 120 fL, eritrócitos microcíticos e macrocíticos são contados quando estão abaixo (microcitos) e acima (macrocitos) desses limites.

Por meio de histograma V/HC, permite-se plotar as populações eritrocitárias e prever alterações morfológicas a partir do comportamento do gráfico. A **Figura 6.20** resume as possibilidades de alterações que podem ser demonstradas nesse histograma. No plote (1) localizam-se os eritrócitos macrocíticos e hipocrômicos; (2) macrocíticos



normocrômicos; (3) macrocíticos hiperocrômicos; (4) normocíticos hipocrômicos; (5) normocíticos e normocrômicos; (6) normocíticos hiperocrômicos; (7) microcíticos hipocrômicos; (8) microcíticos normocrômicos e (9) microcíticos e hiperocrômicos.

Parâmetros adicionais foram instituídos no eritrograma com a tecnologia laser. A HDW (do



inglês *hemoglobin distribution width*) reflete a variação da distribuição da concentração da hemoglobina, sendo parâmetro obtido apenas em equipamentos que determinam a CHCM direta a *laser*. Esse parâmetro torna mais precisa a quantificação da anisocromia que, antes do advento da tecnologia *laser*, era determinada de maneira subjetiva pela morfologia eritrocitária. A variação do peso de hemoglobina também é determinada nos equipamentos que analisam o eritrócito a *laser*. A CHDW corresponde ao coeficiente de variação da

HCM obtida a *laser*. Assim como a HCM varia em função do VCM, a CHDW variará quando houver alteração do volume (RDW aumentado). Os valores de referência para a HDW variam entre 2,2 e 3,2 g/dL, enquanto para a CHDW os valores normais variam entre 3 e 4 pg.<sup>8</sup>

Nos **Quadros 6.5 a 6.10**, são apresentados casos que ilustram a importância dos histogramas da tecnologia a *laser* no diagnóstico das anemias e na conduta do analista clínico diante dessas situações.

QUADRO 6.5 Caso 1

Eritrócitos	2,18	
Hemoglobina	6,9	
Hematócrito	20,7	
VCM	95,2	
HCM	31,6	
CHCM	33,2	
RDW	25,6	
HDW	5,77	V.R. (2,2-3,2)

De acordo com os dados apresentados, o paciente apresenta anemia intensa, com VCM normal e RDW bem elevado, classificada como anemia normocítica e normocrômica, com população eritroide de tamanho heterogêneo. No histograma V/HC da **Figura 6.21**, percebem-se várias possibilidades de alterações morfológicas. No quadrante superior à esquerda, macrócitos hipocrômicos, provavelmente reticulócitos, ou seja, é possível que na extensão sanguínea exista a policromatofilia. No quadrante central à direita, a presença de esferócitos e drepanócitos deve ser pesquisada por serem células hiperocrômicas. No gráfico RBC Volume mostrado na **Figura 6.22**, pode-se concluir que existam tanto micrócitos (esquerda) quanto macrócitos (direita). No gráfico RBC HC, pela grande variação da distribuição de hemoglobina na população eritroide, a presença de anisocromia é confirmada. Há grande variação de tamanho da população eritroide, com deslocamento para a direita, ou seja, indica a presença de eritrócitos grandes. Dessa forma, duas principais causas devem ser pesquisadas: achados morfológicos compatíveis com (1) anemia de caráter carencial, principalmente ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> e (2) distúrbios hemolíticos. No caso em questão, foi verificada intensa policromatofilia, comprovando que o desvio à direita do gráfico se deu pela presença de reticulócitos.

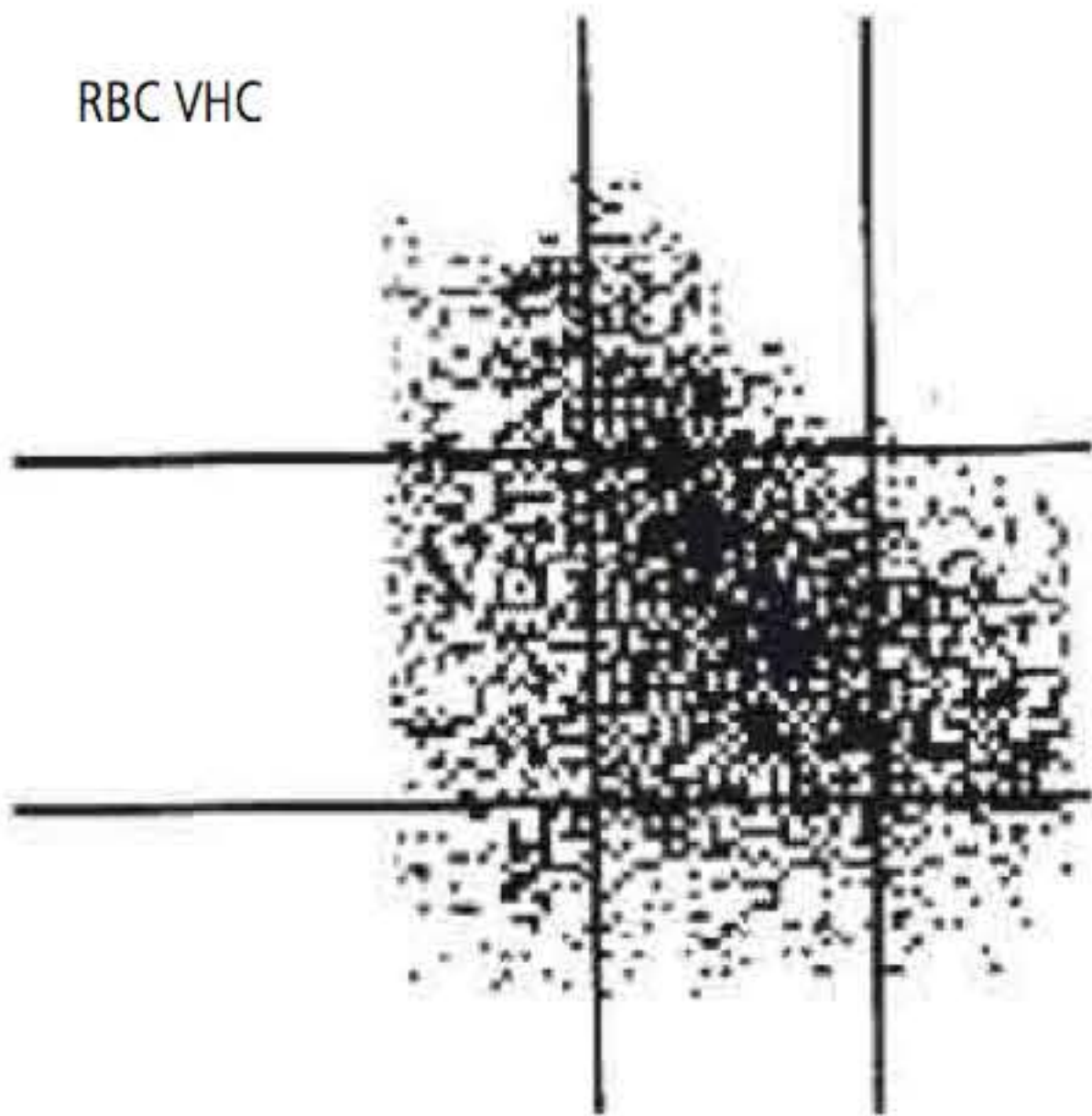


FIGURA 6.21 Histograma V/HC – Caso 1.

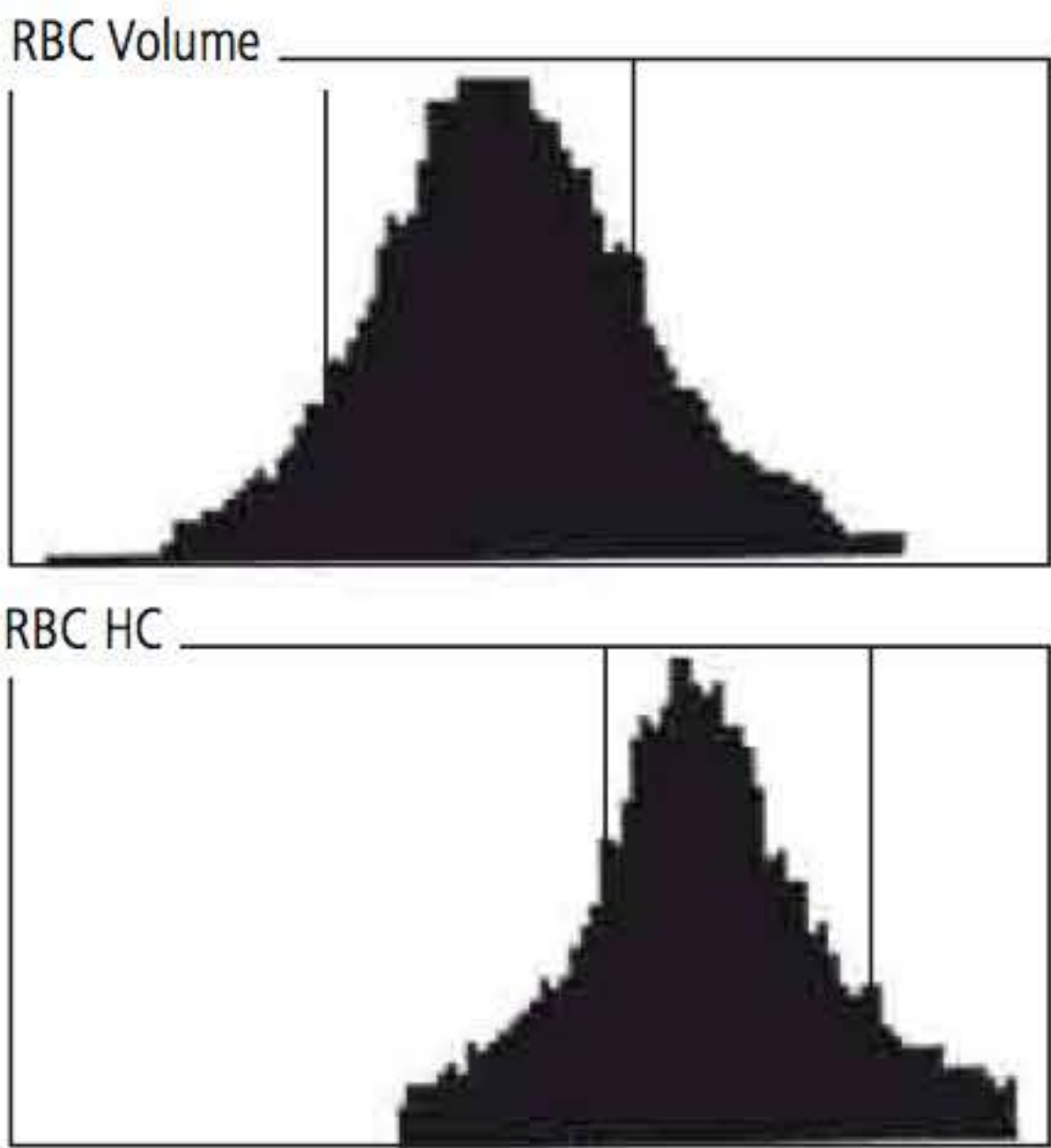


FIGURA 6.22 Gráfico RBC Volume – Caso 1.



QUADRO 6.6

Caso 2

Eritrócitos	3,54	
Hemoglobina	11,9	
Hematócrito	36,2	
VCM	102,4	
HCM	33,8	
CHCM	33,0	
RDW	23,1	
HDW	3,1	V.R. (2,2-3,2)

De acordo com os dados apresentados, o paciente apresenta anemia discreta, macrocítica e normocrômica e RDW elevado. No histograma V/HC mostrado na **Figura 6.23**, percebe-se duas populações eritrocitárias, o que é comprovado pelo gráfico RBC Volume mostrado na **Figura 6.24**. Uma dessas populações é normocítica e normocrômica e outra macrocítica. Pelo gráfico RBC HC, percebe-se que a distribuição da hemoglobina está dentro dos valores de normalidade (HDW normal), ou seja, não há anisocromia. Não há presença de eritrócitos macrocíticos e hipocrômicos (provavelmente reticulócitos), o que descarta episódio hemolítico. É provável que esse quadro ilustre o tratamento de anemia macrocítica de causa carencial.

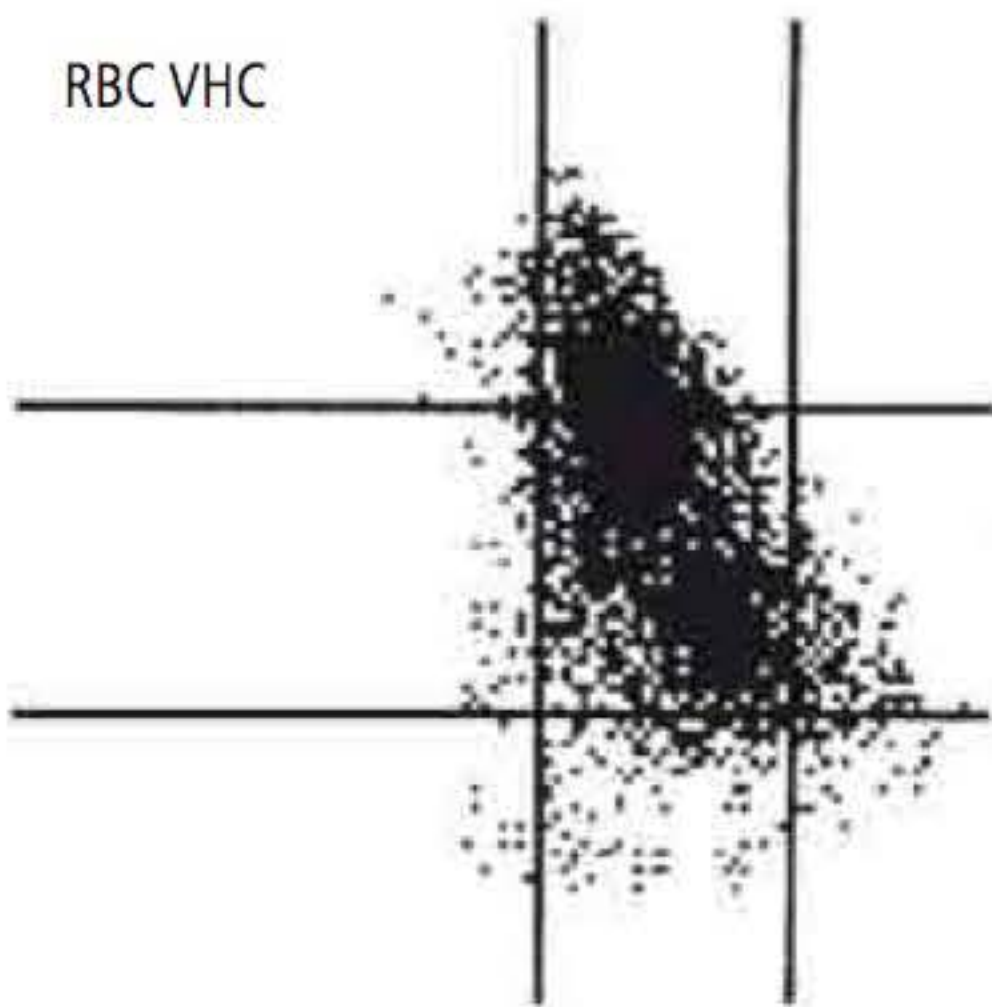


FIGURA 6.23 Histograma V/HC – Caso 2.

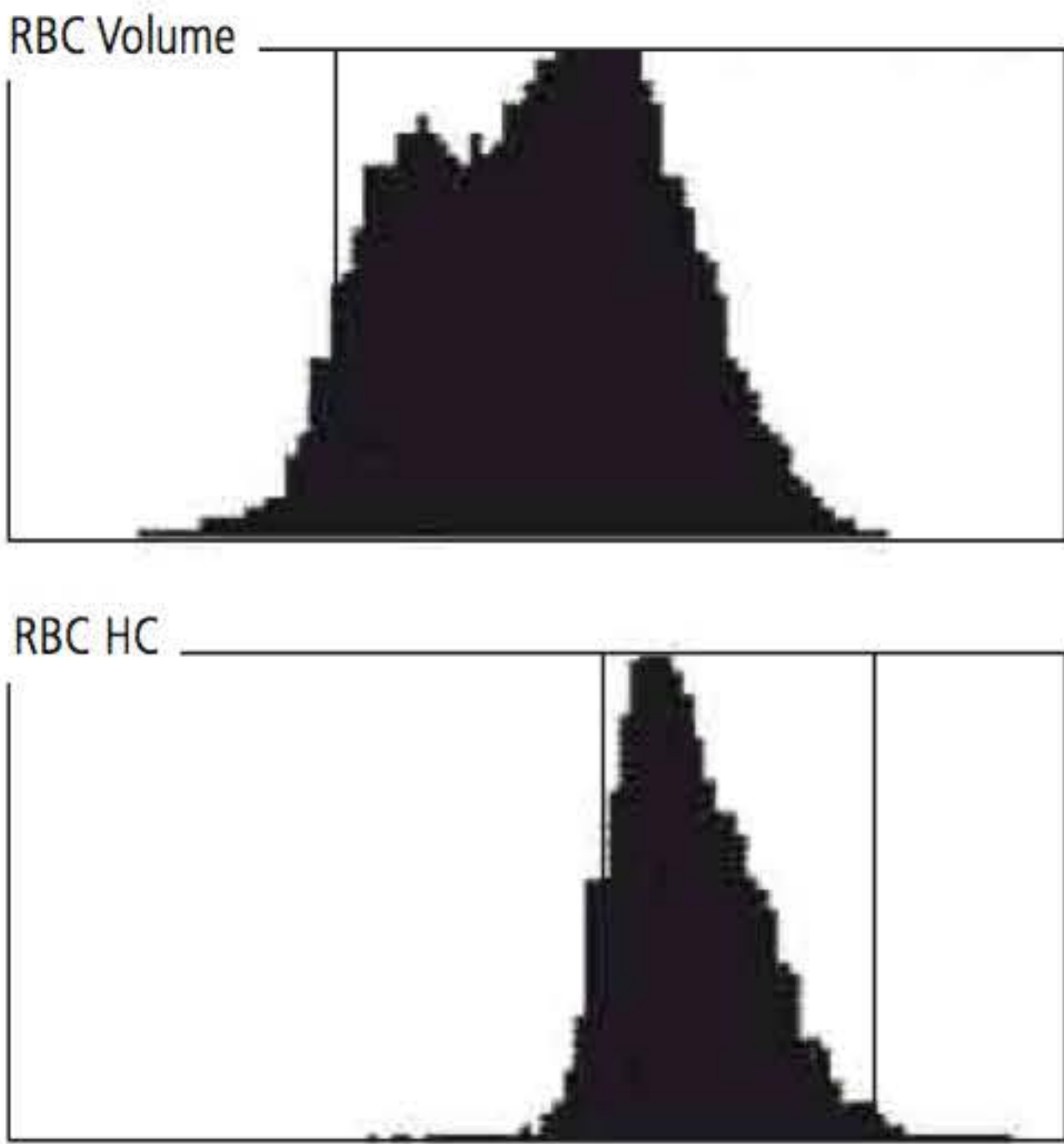


FIGURA 6.24 Gráfico RBC Volume e RBC HC – Caso 2.

QUADRO 6.7

Caso 3

Eritrócitos	4,0	
Hemoglobina	9,3	
Hematócrito	28,7	
VCM	71,8	
HCM	23,3	
CHCM	31,5	
RDW	20,4	
HDW	3,3	V.R. (2,2-3,2)

De acordo com os dados apresentados, o paciente apresenta anemia microcítica hipocrômica, com população eritrocitária de tamanho variado (RDW alto). Pelo histograma, é evidente o predomínio de eritrócitos microcíticos em relação aos hipocrômicos (**Figura 6.26**). O HDW está discretamente elevado, ou seja, existem eritrócitos normocrômicos (maioria) e hipocrômicos (à esquerda). O predomínio de microcitose sobre a hipocromia indica talassemias heterozigotas, porém o RDW aumentado sugere anemia ferropriva. Estes dados correspondem a um paciente talassêmico com deficiência de ferro.

(continua)



QUADRO 6.7 Caso 3 (continuação)

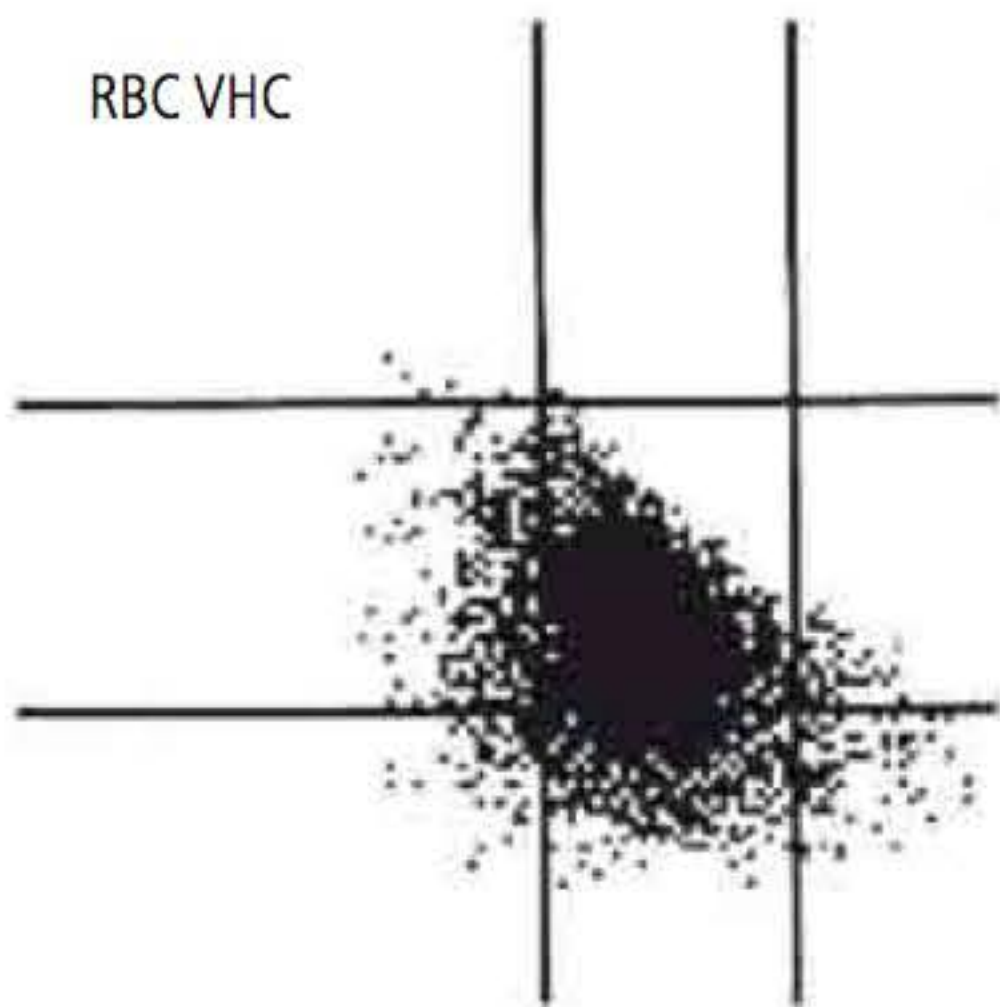


FIGURA 6.25 Histograma V/HC – Caso 3.

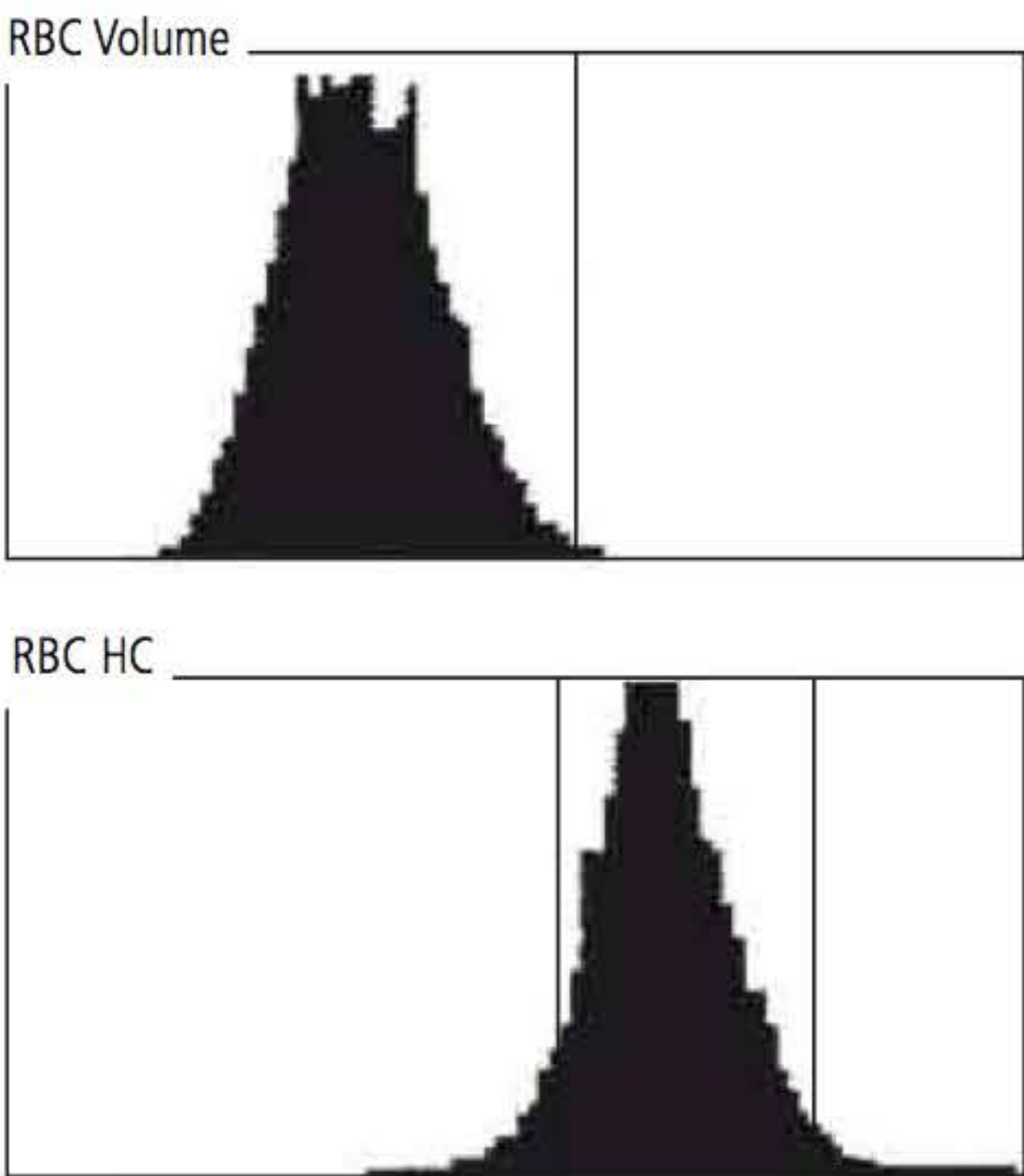


FIGURA 6.26 Gráfico RBC Volume e RBC HC – Caso 3.

QUADRO 6.8 Caso 4

Eritrócitos	3,75	
Hemoglobina	9,7	
Hematócrito	29,6	
VCM	78,9	
HCM	26,0	
CHCM	31,4	
RDW	18,0	
HDW	4,53	V.R. (2,2-3,2)

Os dados apresentados caracterizam uma anemia moderada com microcitose e hipocromia e RDW elevado. Verifica-se no citograma V/HC (Figura 6.27) a formação de duas populações de eritrócitos em termos de concentração de hemoglobina, uma hipocrômica e outra normocrômica. O HDW confirma a anisocromia. O gráfico RBC Volume (Figura 6.28) confirma a anisocromia. O caso é compatível com tratamento de uma anemia carencial por ferro.

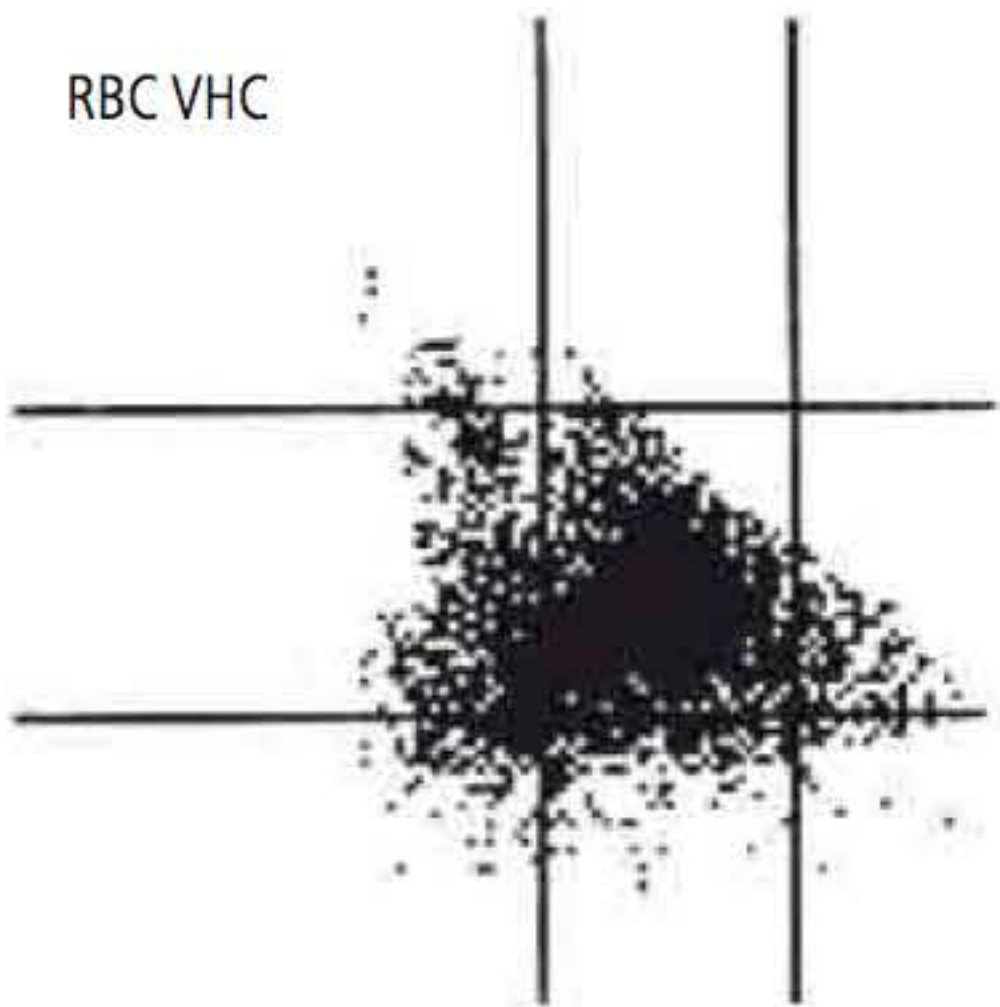


FIGURA 6.27 Histograma V/HC – Caso 4.

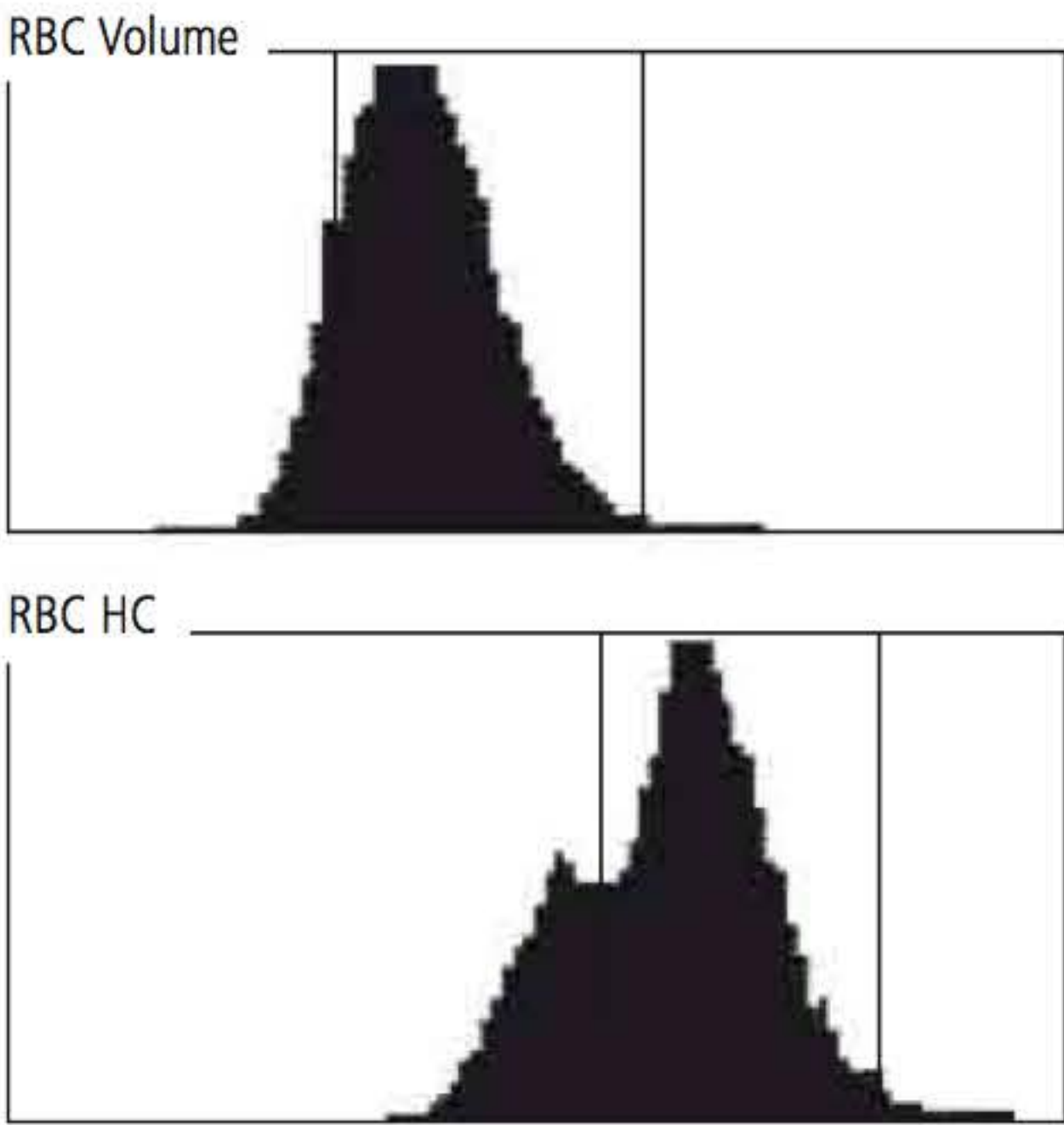


FIGURA 6.28 Gráfico RBC Volume e RBC HC – Caso 4.



QUADRO 6.9

Caso 5

Eritrócitos	2,84	
Hemoglobina	8,4	
Hematócrito	26,0	
VCM	91,6	
HCM	29,7	
CHCM	29,9	
RDW	28,4	
HDW	3,77	V.R. (2,2-3,2)

Os dados apresentados apontam anemia normocítica e hipocrômica. Pela variação do RDW, são observados eritrócitos normocíticos e uma fração menor, macrocítica. Os eritrócitos macrocíticos e hipocrômicos (quadrante esquerdo superior da [Figura 6.29](#)) são compatíveis com reticulócitos; portanto, na extensão sanguínea provavelmente será encontrada policromatofilia. A hipocromia também pode ser observada no gráfico RBC HC da [Figura 6.30](#). O paciente, provavelmente, está em hemólise.

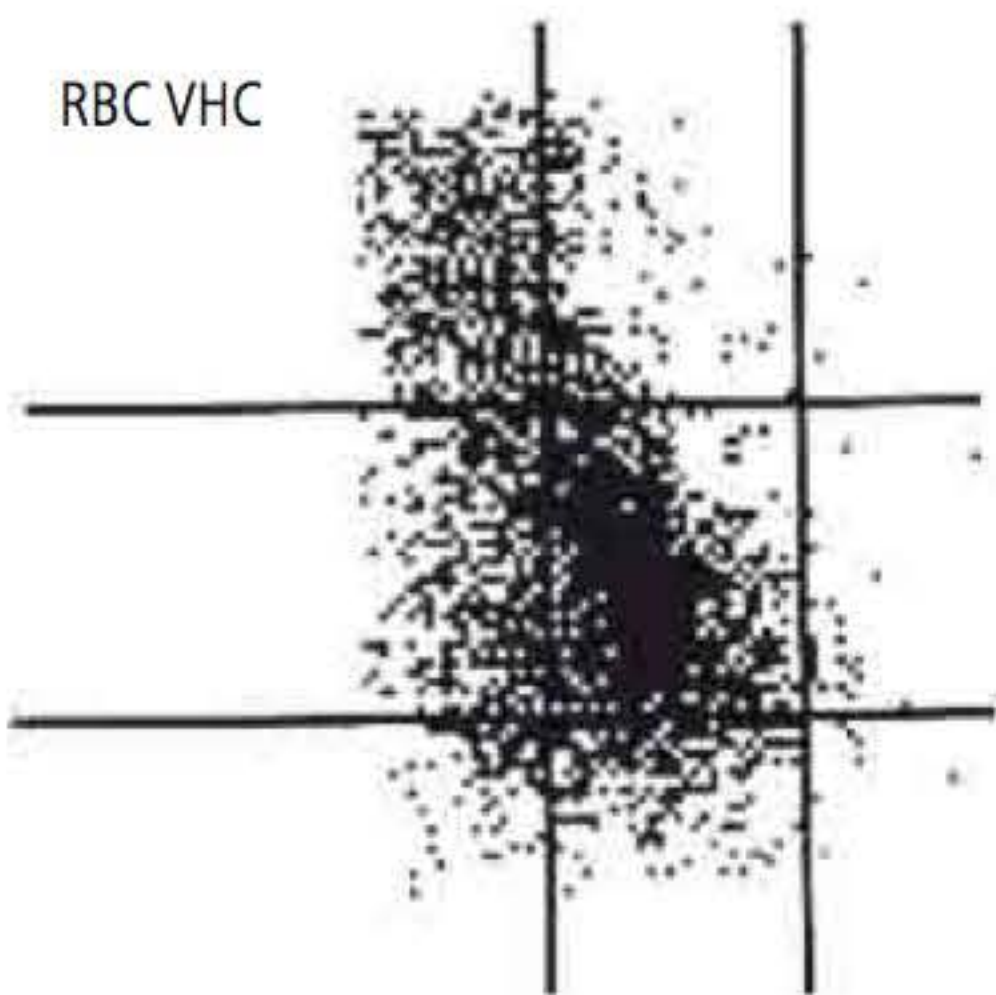


FIGURA 6.29 Histograma V/HC – Caso 5.

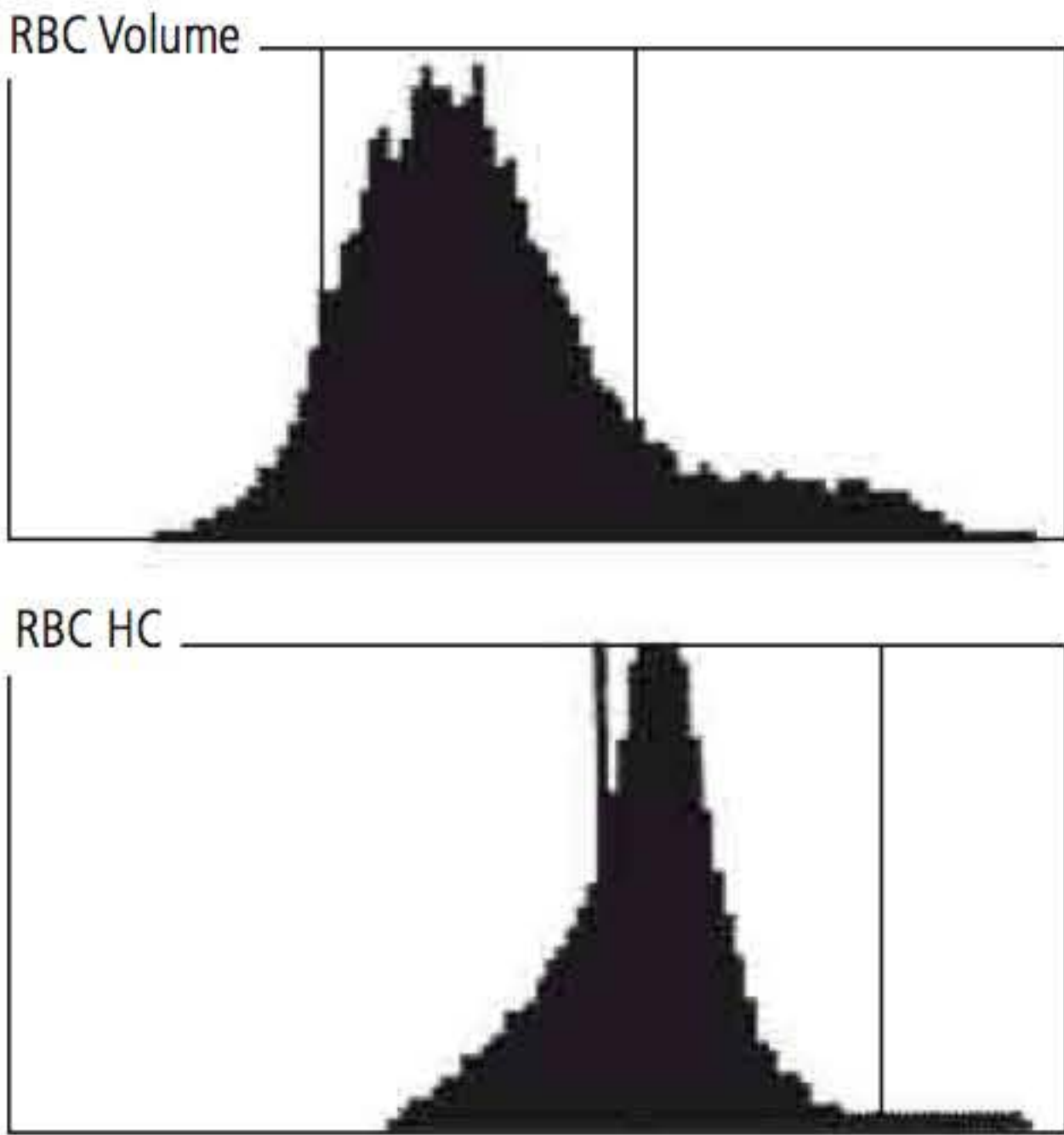


FIGURA 6.30 Gráfico RBC Volume e RBC HC – Caso 5.

QUADRO 6.10

Exemplo 6

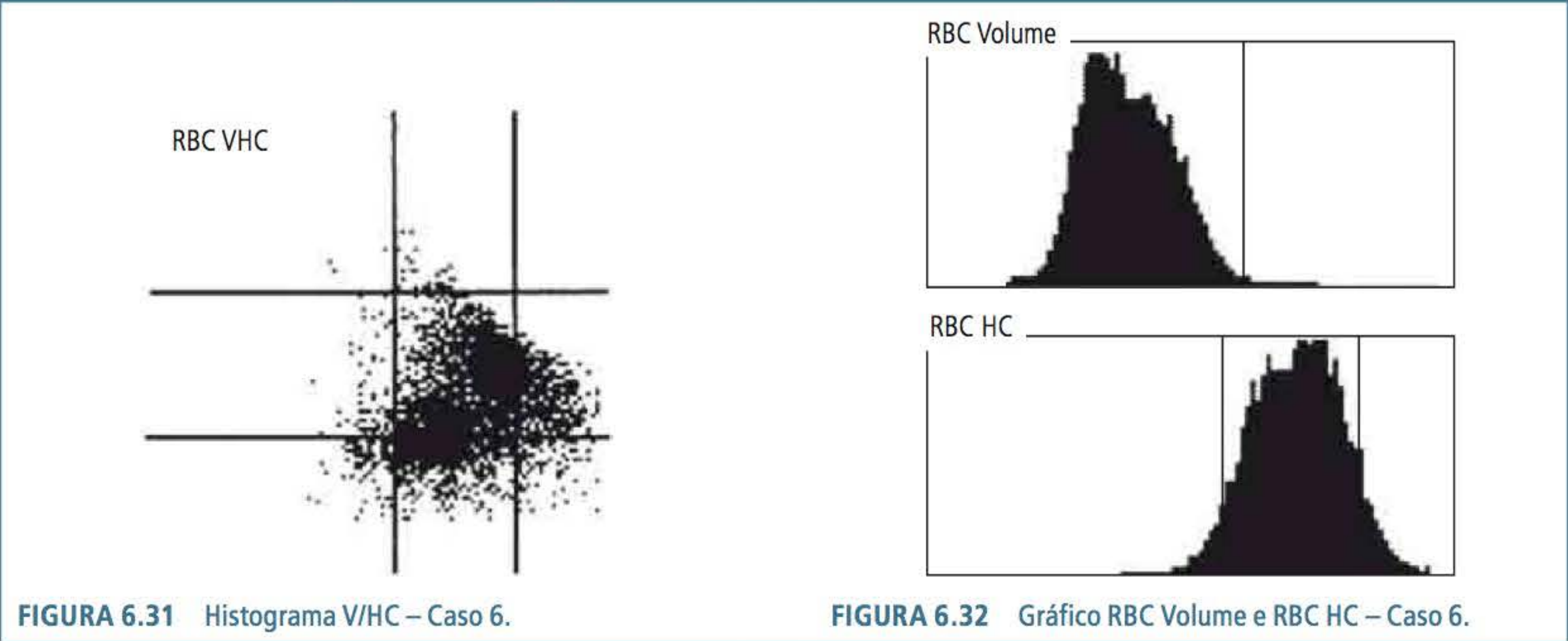
Eritrócitos	3,52	
Hemoglobina	9,4	
Hematócrito	26,4	
VCM	75,0	
HCM	26,6	
CHCM	35,5	
RDW	22,1	
HDW	4,37	V.R. (2,2-3,2)

Os dados apresentam uma anemia microcítica e normocrômica. Tanto no histograma V/HC da [Figura 6.31](#), quanto no gráfico RBC volume da [Figura 6.32](#), é possível perceber duas populações de eritrócitos. A presença de anisocromia pode ser percebida pelo aumento do HDW, que é confirmado pelo gráfico RBC HC ([Figura 6.32](#)). No paciente com anemia ferropriva em início de tratamento, a população microcítica é maior que a normocítica.

(continua)



QUADRO 6.10 Exemplo 6 (continuação)



CLASSIFICAÇÃO DAS ANEMIAS

Na prática clínica, a anemia pode ser classificada a partir de dois critérios: (1) morfológico e (2) fisiopatológico. Primeiramente, analisa-se a classificação morfológica e, em seguida, a classificação fisiopatológica.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Como comentado anteriormente, o primeiro passo para o diagnóstico de uma anemia é analisar a concentração de hemoglobina. Para isso, os valores de normalidade devem ser familiares ao profissional do setor de hematologia, sendo imprescindível a adequação dessa análise a fatores como idade, sexo e altitude. Uma vez reconhecida a queda da hemoglobina (conforme exemplo da Tabela 6.3), o VCM, a CHCM e o RDW são importantes para a classificação morfológica das anemias.

TABELA 6.3 Resultados de um eritrograma evidenciando queda da hemoglobina	
Eritrócitos	4,77
Hemoglobina	9,0
Hematócrito	31,6
VCM	66,2
HCM	18,9
CHCM	28,5
RDW	18,1

Valor de referência da hemoglobina: 12 a 16 g/dL.

A anemia pode ser classificada de acordo com o tamanho (VCM), a concentração de hemoglobina (CHCM) e variação do tamanho (RDW) da

população eritrocitária. O VCM é parâmetro chave para a classificação das anemias, pois, estando abaixo do normal, indica microcitose; eritrócitos de tamanho normal, normocitose enquanto que o aumento do tamanho dos eritrócitos indica macrocitose. A CHCM reflete a cromaticidade dos eritrócitos, avaliando a presença de hipocromia ou da hiperchromia, enquanto o RDW reflete a homogeneidade ou não do tamanho da população de eritrócitos. Wallace Wintrobe foi o primeiro a utilizar essas nomenclaturas na rotina laboratorial. O Quadro 6.11 resume esta classificação.

QUADRO 6.11 Classificação morfológica das anemias segundo o VCM e a CHCM		
MICROCÍTICA HIPOCRÔMICA	NORMOCÍTICA NORMOCRÔMICA	MACROCÍTICA
VCM alto	VCM normal	VCM alto
CHCM baixa	CHCM normal	

Com a introdução do RDW na rotina laboratorial na década de 1980, vários estudos propuseram uma nova classificação para as anemias. Bessman e colaboradores,<sup>9</sup> estudando 1270 pacientes com várias situações clínicas, classificaram as anemias de acordo com o perfil do VCM e do RDW (Quadro 6.12). A classificação proposta está resumida no Quadro 6.11. O uso do RDW melhorou a diferenciação da anemia ferropriva e os estados heterozigotos das talassemias  $\beta$  e  $\alpha$ , além disso, o aumento isolado do RDW pode ser considerado uma alteração precoce que indica a instalação das anemias carenciais. Além do RDW, o uso dos histogramas de distribuição celular me-



lhorou o entendimento do comportamento dos eritrócitos em algumas situações específicas.

QUADRO 6.12 Classificação das anemias com base no VCM e no RDW	
VCM BAIXO RDW NORMAL	VCM BAIXO RDW ALTO
Talassemias heterozigotas Doenças crônicas  VCM Normal RDW Normal Normal Leucemia linfocítica crônica Esferocitose hereditária Hemoglobinopatias heterozigotas (AS, AC, etc.)	Deficiência de ferro S-β talassemia Hemoglobina H Fragmentação eritrocitária VCM normal RDW alto Anemia sideroblástica Anemia falciforme Início da deficiência de ferro Início da deficiência de folato e vitamina B <sub>12</sub>
VCM ALTO RDW NORMAL	VCM ALTO RDW ALTO
Anemia aplástica	Deficiência de folato e vitamina B <sub>12</sub> Anemia hemolítica autoimune Criaglutininas a frio

CLASSIFICAÇÃO FISIOPATOLÓGICA

Esta classificação baseia-se no comportamento da contagem de reticulócitos, que avalia a capacidade da medula óssea em responder à queda da concentração da hemoglobina. Quando a anemia apresenta capacidade regenerativa normal, deve existir uma relação inversa entre a concentração de hemoglobina e a contagem de reticulócitos (anemia regenerativa). Por outro lado, quando a anemia não é acompanhada por um aumento proporcional dos reticulócitos, o quadro é classificado como arregenerativo (anemia arregenerativa) (Figura 6.33).

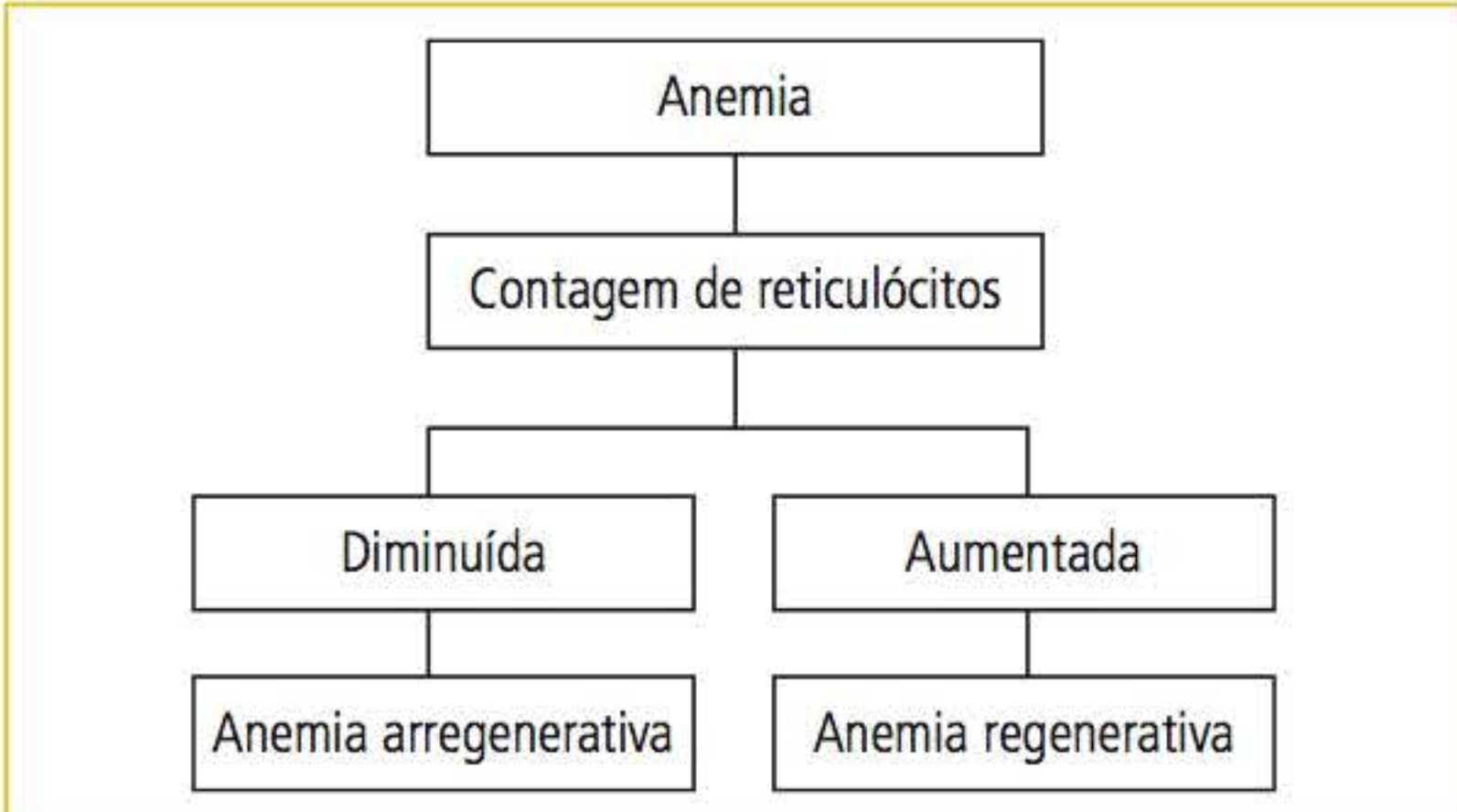


FIGURA 6.33 Classificação fisiopatológica das anemias.

Como a contagem de reticulócitos é fundamental para essa classificação, é importante entender sua importância, como o teste é realizado e quais as tendências dessa contagem na rotina laboratorial.

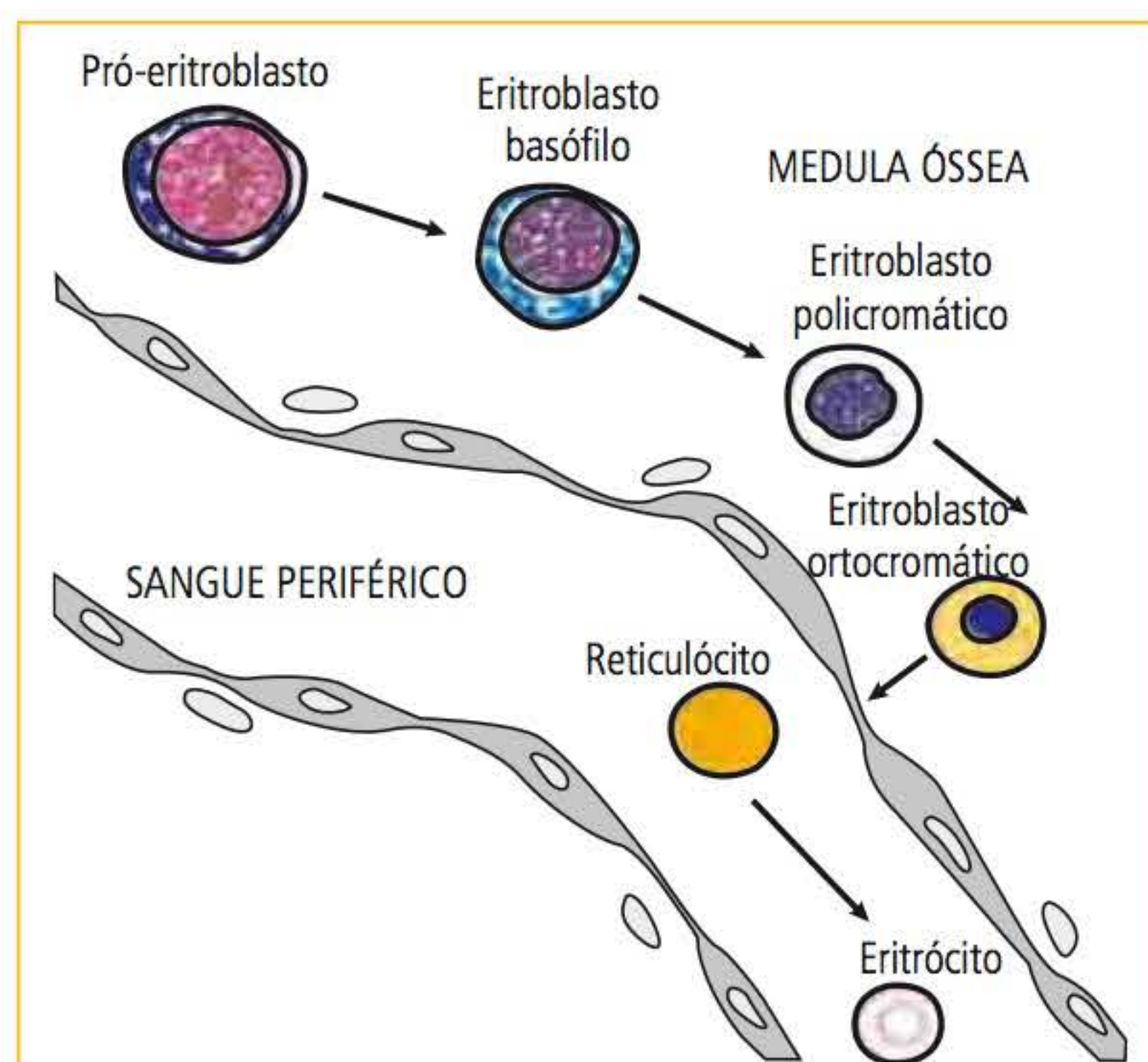
Reticulócitos – considerações gerais

Na avaliação das anemias, é fundamental ter o conhecimento da capacidade da medula óssea em responder a esse processo com a produção de novas células, e uma forma simples para essa avaliação é determinar o número de eritrócitos imaturos no sangue periférico. Portanto, a contagem de reticulócitos é um indicador indireto da atividade eritropoiética da medula óssea. Essa contagem é especialmente importante para o entendimento de mecanismos fisiológicos ou da cinética dos eritrócitos na instalação das anemias. Três categorias de anemias podem ser distintamente classificadas por meio de contagem de reticulócitos: anemias hipoproliferativas, quando a medula não consegue aumentar a produção dos eritrócitos; anemias devidas a defeitos de maturação, com hiperplasia medular, porém com apoptose dos eritrócitos na própria medula, situação denominada de eritropoiese ineficaz; e anemias hemolíticas ou processos hemorrágicos agudos, casos em que a medula aumenta a sua produção, e os eritrócitos imaturos são liberados no sangue periférico.<sup>1</sup>

Os reticulócitos são células que derivam do processo de maturação eritroide após as fases de pró-eritroblasto a eritroblasto ortocromático. O tempo de maturação do pró-eritroblasto a eritrócito maduro tem duração de 3 a 5 dias, período em que ocorre uma série de modificações morfológicas e bioquímicas que define os estágios de maturação eritroide (Figura 6.34). Entre essas alterações podem-se destacar: síntese aumentada de hemoglobina; perda do aparato celular para síntese de proteínas; condensação, contração e extrusão do núcleo; diminuição da expressão dos receptores de membrana; modificação nos níveis de colesterol e fosfolípidos na membrana eritrocitária; e mudanças nas concentrações de algumas enzimas eritrocitárias, como a G6-PD.<sup>10</sup>

Após a perda do núcleo nos eritroblastos, restam na célula algumas organelas como ribossomos, RNA mensageiro e mitocôndrias que absorvem corantes supravitais, podendo ser identificadas morfológicamente pela microscopia ótica. O próprio nome (reticulócito) se deve aos precipitados de tonalidade azul que as células apresentam após





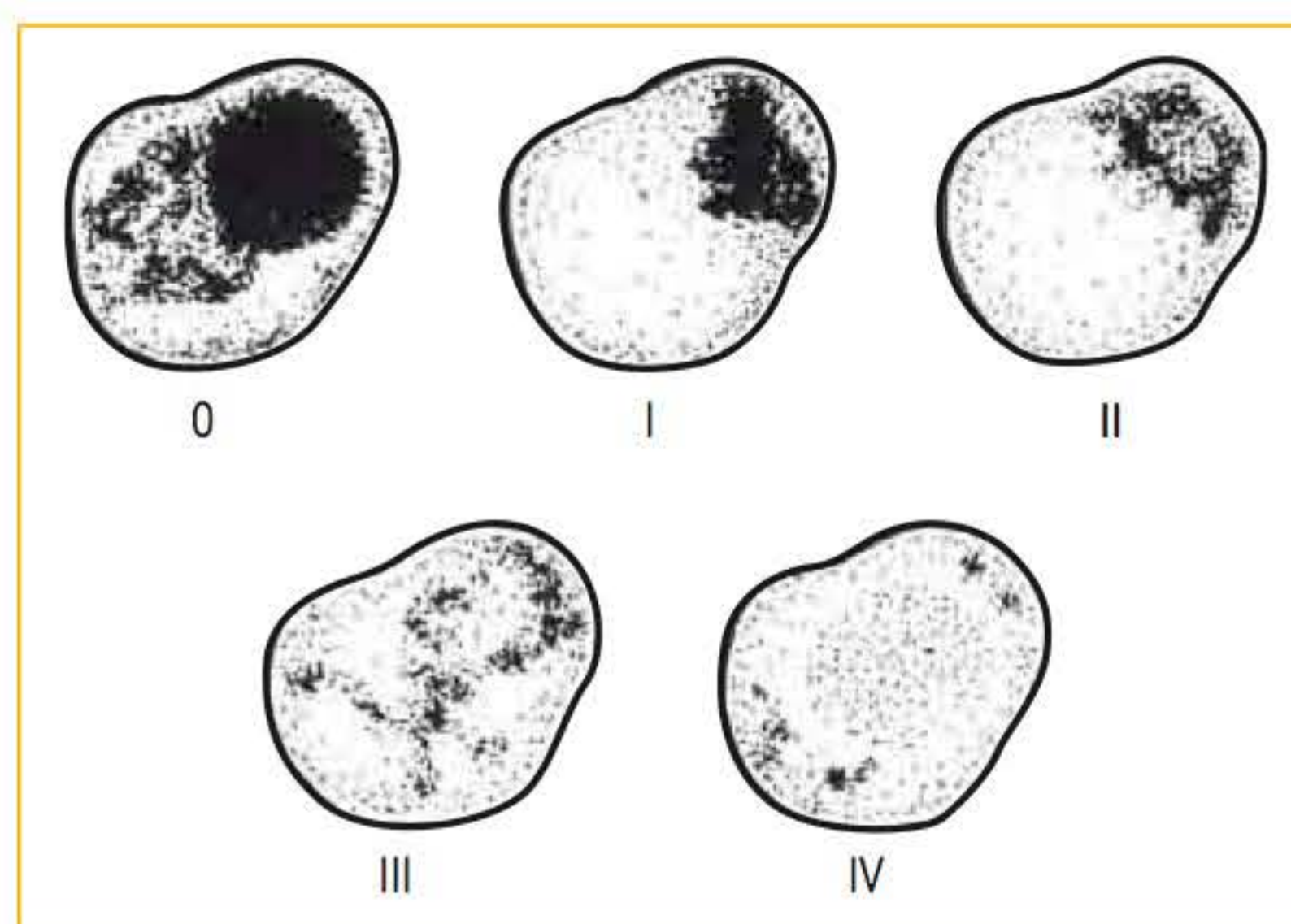
**FIGURA 6.34** Maturação eritroide: a primeira célula eritroide que pode ser identificada pela microscopia ótica é o pró-eritroblasto, sofrendo ao longo de aproximadamente 5 dias uma série de modificações estruturais, tais como diminuição de volume e aumento da síntese de hemoglobina.

a coloração com corantes heterocromáticos tricíclicos, como o azul de metileno.<sup>10</sup> A transformação do reticulócito para eritrócito maduro leva aproximadamente 48 horas.

Ao longo do processo de maturação eritroide, observam-se diminuição do volume celular e aumento na síntese de hemoglobina. Na fase de reticulócito, o volume celular é cerca de 20% maior que o eritrócito maduro, e 20 a 30% da síntese da hemoglobina ocorre em reticulócitos mais imaturos (maior quantidade de retículos). A medida que as organelas citoplasmáticas são perdidas pelos reticulócitos (menor quantidade de retículos), a síntese de hemoglobina diminui proporcionalmente a essa perda. Após dois dias na medula óssea, o reticulócito é liberado para o sangue periférico para terminar o processo de maturação e se transformar em eritrócito maduro.

A determinação da “idade” do reticulócito é alvo de estudo desde a década de 1930. Heilmeyer e Westhäuser, usando corantes supravitais, classificaram os reticulócitos em 4 grupos (Grupos I a IV). Eritroblastos foram classificados como grupo 0 (a Figura 6.35 ilustra essa classificação). Os reticulócitos mais jovens (imaturos), classificados como I, são reticulócitos que apresentam massa consistente de RNA e outras organelas, enquanto o reticulócito do tipo II possui rede reticular com menor

condensação. Quando a quantidade de RNA diminui, o reticulócito passa a ser classificado em III ou IV, dependendo da concentração de RNA. A informação que é revelada pela determinação da maturação dos reticulócitos pode ser mais valiosa do que a própria contagem percentual ou absoluta dessa célula; porém, pela dificuldade que a técnica manual possui, essa determinação não é realizada na rotina laboratorial. Com o advento de analisadores hematológicos mais modernos, a maturação dos reticulócitos tornou-se mais acessível e confiável para sua interpretação.<sup>11</sup>



**FIGURA 6.35** Determinação da maturação dos reticulócitos segundo Heilmeyer e Westhäuser (1930).

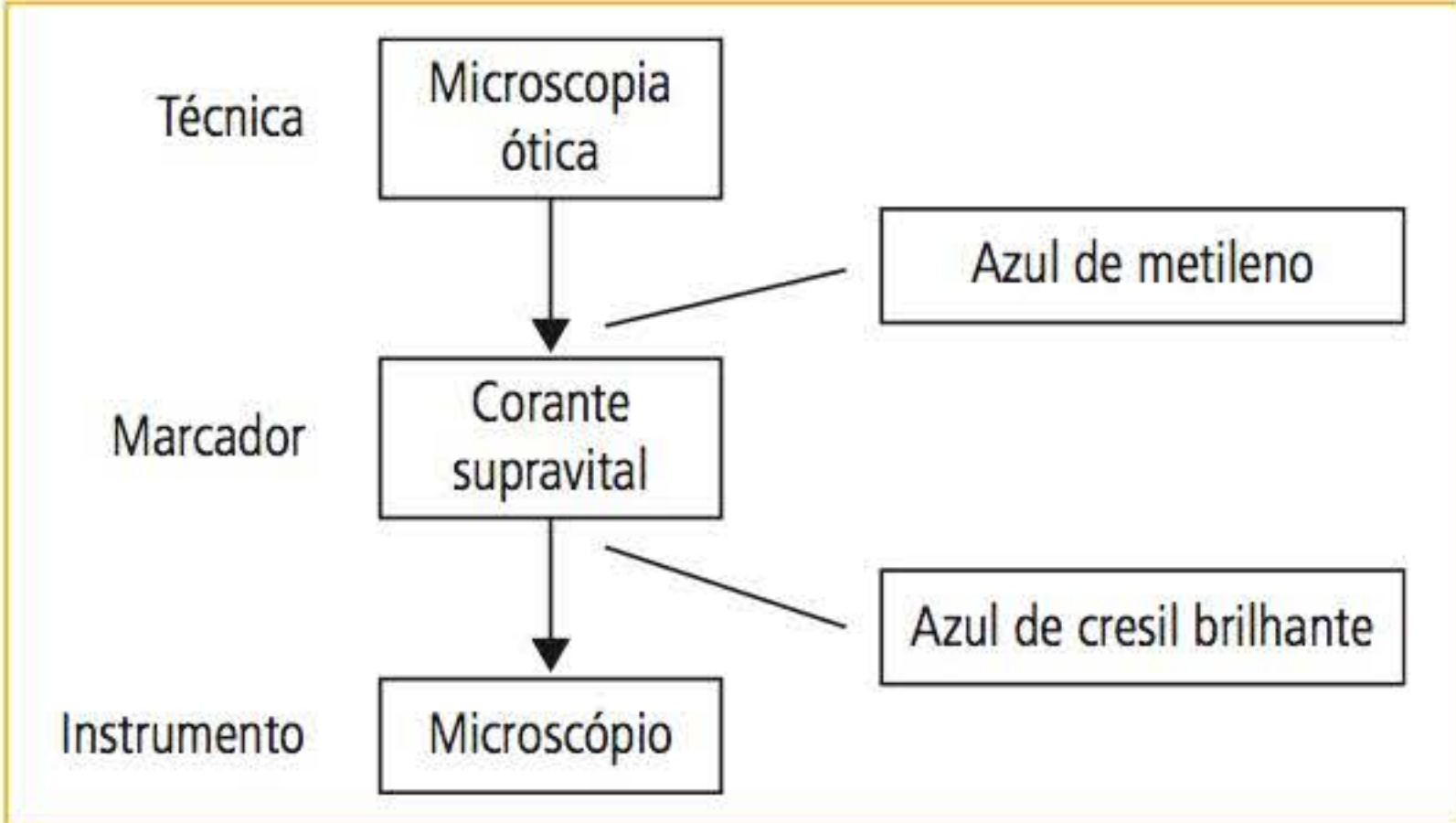
0, eritroblasto; I e II, reticulócitos imaturos; III e IV, reticulócitos maduros.

### Contagem manual de reticulócitos

A técnica original para a contagem de reticulócitos no sangue periférico usa como princípio a detecção de restos de RNA no citoplasma do reticulócito por meio de corantes supravitais, como o azul de metileno e o azul de cresil. Por cerca de 40 anos (1940-1980) essa técnica usando microscopia ótica foi o único método disponível para se avaliar a contagem de reticulócitos na rotina laboratorial. Na contagem manual, o sangue é misturado com o corante na proporção de 1:1. Após homogeneização da mistura, ela é colocada em banho-maria a 37 °C durante 15 a 20 minutos.<sup>12</sup> Decorrido esse tempo, a mistura é novamente homogeneizada e são confeccionadas extensões para a realização da contagem de reticulócitos. Devem ser calculados em objetiva de imersão mil eritrócitos e, anotado o número de reticulócitos contados, a porcentagem de reticulócitos deve ser calculada para expressar o valor relativo. Antes da realização da contagem de reticulócitos, pode-se contra corar a



extensão que foi confeccionada a partir da solução 1:1. A técnica de contra-coloração permite que o reticulócito fique mais evidente, consistindo tecnicamente em corar a lâmina com os corantes hematológicos. Quando for utilizada a técnica de coloração pelo corante de May-Grünwald-Giemsa, após a adição da água ou tampão sobre o May-Grünwald, lava-se a extensão e então, depois de seca, a contagem pode ser realizada. A **Figura 6.36** ilustra a técnica, o marcador e o instrumento necessário para a realização da técnica manual.



**FIGURA 6.36** Técnica, marcadores e instrumentos necessários para a realização da técnica manual para a contagem de reticulócitos.

O valor de referência em porcentagem de reticulócitos (valor relativo) para adultos (como adulto, para a interpretação da contagem de reticulócitos, considera-se após 7 dias de vida) é de 0,5 a 1,5%. A **Tabela 6.4** mostra os valores de referência, em porcentagem (valor relativo), para adultos, sangue de cordão umbilical e recém-nascido (RN) até 7 dias.

TABELA 6.4 Valores de referência, em porcentagem (valor relativo), para a contagem reticulócitos						
	ADULTOS	SANGUE DE CORDÃO	RN	RN 01 DIA	RN 03 DIAS	RN 07 DIAS
Valor relativo (%)	0,5-1,5	6,0-10,0	2,5-6,5	4	3	0,5

A contagem de reticulócitos deve também ser interpretada pelo valor absoluto. Para isso, multiplica-se o valor relativo pela contagem de eritrócitos (obtida no hemograma) e divide-se por 100. O **Quadro 6.13** mostra o cálculo do valor absoluto dos reticulócitos e os valores de referência.

QUADRO 6.13 Cálculo do valor absoluto de reticulócitos e os valores de referência	
CONTAGEM ABSOLUTA DE RETICULÓCITOS	
Contagem percentual X Número de eritrócitos (Eritrograma)	
100	
EXEMPLO	
DADOS DO ERITROGRAMA RBC = 4,67 x 10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> HGB = 13,9 g/dL HCT = 42	Contagem manual de reticulócitos % = 1,4  Contagem absoluta: 1,4% X 4.670.000/100 = 65.380 reticulócitos/μL
	Valor de referência: 50-150.000 reticulócitos/μL

**Considerações técnicas**  
Apesar da reconhecida importância da contagem de reticulócitos para a classificação das anemias, esse teste é surpreendentemente pouco solicitado pela maioria dos clínicos na rotina médica. Esse quadro pode ser explicado pela falta de confiabilidade e precisão da contagem manual de reticulócitos. As razões para isso são:

1. O pequeno número de células contadas. Estatisticamente, a contagem de mil eritrócitos não é suficientemente representativa, uma vez que os reticulócitos em condições normais não ultrapassam 1% dessas células; dessa forma, o coeficiente de variação em contagens normais pode chegar a 50%;
2. Tempo necessário para a enumeração dos eritrócitos, o que torna o trabalho lento e tedioso, o que induz a erros de contagem;
3. A comprovada variação interobservador entre os profissionais que realizam a técnica. Estudos revelam erros de identificação dos reticulócitos, principalmente em reticulócitos mais maduros;
4. A qualidade do corante supravital. Corantes com baixa qualidade podem formar precipitados artefatuais, o que dificulta a identificação dos reticulócitos.

O total de células contadas é importante para a precisão do teste. Na contagem de 100 eritrócitos, por exemplo, com limite de confiança de 95%, a variação normal da contagem pode girar entre 0,03 a 5,45% com 1% de reticulócitos na amostra. Contando mil eritrócitos, essa variação (1% de reticulócitos) diminui entre 0,46 e 1,84%.<sup>11</sup> A **Figura**



6.37 ilustra um campo com três reticulócitos com graus variados de retículos. Reticulócitos mais maduros apresentam poucos retículos (reticulócito à esquerda), enquanto em reticulócitos mais jovens a rede reticular é mais evidente (reticulócitos à direita).



FIGURA 6.37 Morfologia dos reticulócitos.

Outro problema relacionado à contagem de reticulócitos é a variação desse teste entre os laboratórios. Estudos realizados pelo CAP (College of American Pathologists), nas décadas de 1970 e 1980, demonstraram coeficiente de variação interlaboratórios na ordem de 25 a 48%. Devido a esse quadro preocupante, o CAP recomendou o uso do disco de Miller (Figura 6.38) para minimizar essas variações.

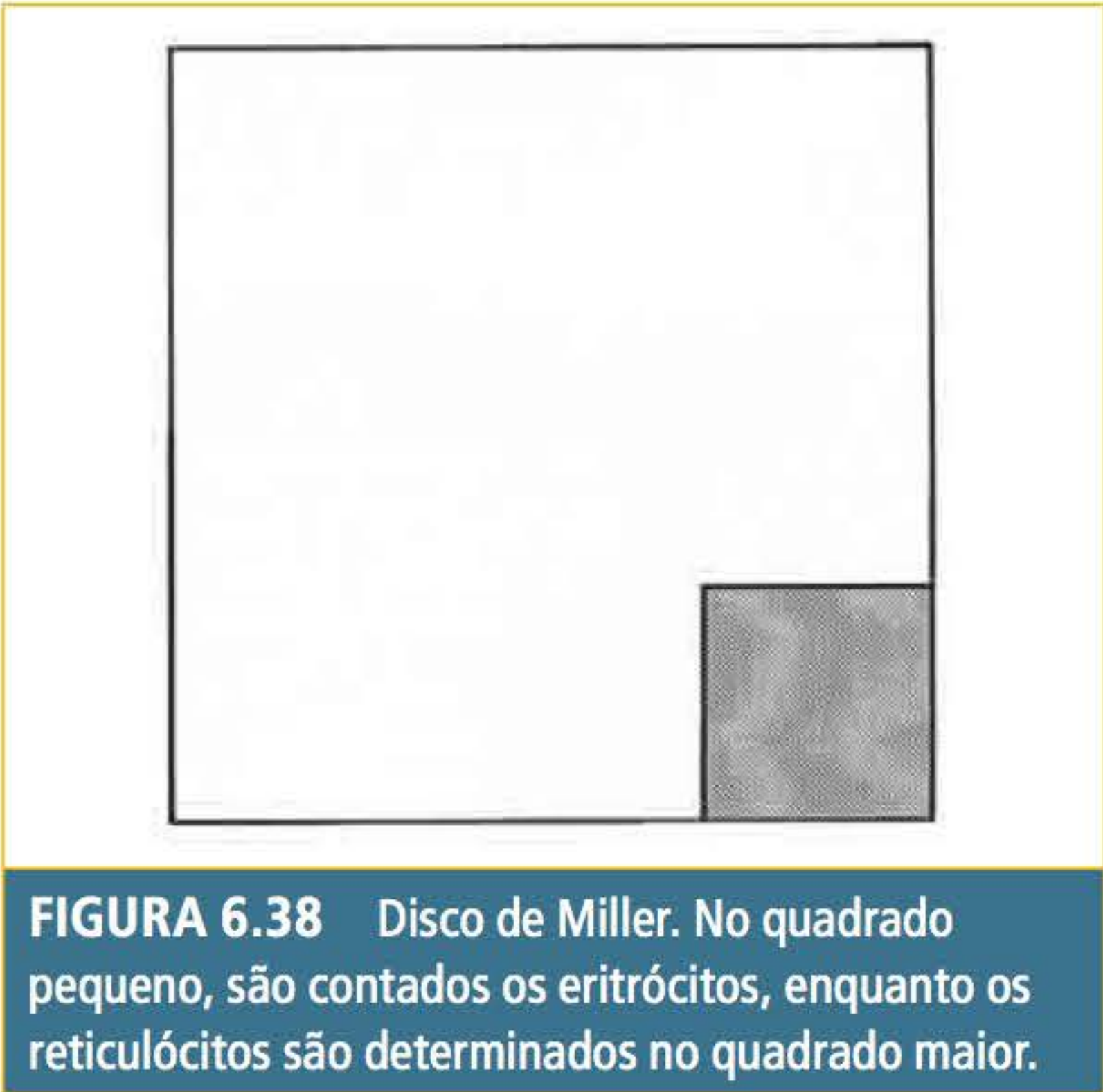


FIGURA 6.38 Disco de Miller. No quadrado pequeno, são contados os eritrócitos, enquanto os reticulócitos são determinados no quadrado maior.

O disco de Miller contém um pequeno quadrado dentro de um quadrado maior. O quadrado

menor corresponde à décima parte da área total do disco. O número de eritrócitos é contado no quadrado menor, enquanto os reticulócitos são contados no quadrado maior. Em geral, em aumento de imersão, são encontrados entre 7 e 10 eritrócitos no quadrado menor, ou seja, em 10 a 15 campos são encontrados cerca de mil eritrócitos. A fórmula para a determinação da contagem de reticulócitos usando o disco de Miller é:

% Reticulócitos =  $\frac{\text{Total de reticulócitos quadrado grande}}{\text{Total de eritrócitos quadrado pequeno} \times 9} \times 100$

Contagem corrigida de reticulócitos e índice de produção reticulocitária

A correção da contagem percentual de reticulócitos se faz necessária quando existe alguma alteração nos parâmetros do eritrograma ou quando existem sinais de estimulação da medula óssea, como nas anemias graves. O valor relativo pode ser superestimado pelo fato de o tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico aumentar com a queda da hemoglobina. A contagem corrigida de reticulócitos, portanto, é recomendada em pacientes anêmicos para que não se tenha um falso aumento da contagem.<sup>13</sup> O Quadro 6.14 traz a fórmula para o cálculo da contagem corrigida de reticulócitos.

QUADRO 6.14 Cálculo da contagem de reticulócitos (CCR)

$$CCR = \frac{CR\% \times VGP}{VGN}$$

CR% = Contagem de reticulócitos em %  
VGP = Volume globular do paciente  
VGN (45%) = Volume globular normal

Um exemplo do uso dessas correções na contagem de reticulócitos pode ser observado em condições de estímulo aumentado na medula óssea. Nessas condições, macroreticulócitos jovens são liberados no sangue periférico, encurtando o seu tempo de maturação na medula óssea e permanecendo mais tempo no sangue periférico. Ao acrescentar o tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico à fórmula da contagem corrigida de reticulócitos, obtém-se o índice de produção de reticulócitos (IPR). A melhor maneira de interpretar a contagem de reticulócitos é associar ao valor relativo à contagem absoluta e o



IPR. O **Quadro 6.15** mostra a fórmula para o cálculo do índice de produção reticulocitária (IPR).

O tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico (TMRSP) em dias está relacionado com o volume globular. Indivíduos com o VG dentro do valor de referência têm um TMRSP igual a 1. Na medida em que o VG diminui, o TMRSP aumenta, sendo uma tentativa da medula óssea em fazer o reticulócito circular por mais tempo para compensar a sobrevida diminuída do eritrócito. Os **Quadros 6.15 e 6.16** trazem a variação do TMRSP (em dias) com relação ao VG.

**QUADRO 6.15** Cálculo do índice de produção de reticulócitos (IPR)

$$\text{Índice de prod. reticulocitária} = \frac{\text{Contagem corrigida do RT}}{\text{Tempo de maturação do RT no sangue periférico (tabela)}}$$

**QUADRO 6.16** Tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico

HEMATÓCRITO	TEMPO DE MATURAÇÃO DO RT
40-45	1 dia
35-39	1,5 dias
25-34	2 dias
15-24	2,5 dias
Abaixo de 15	3 dias

Indivíduos não anêmicos apresentam um equilíbrio entre a produção e a destruição eritrocitária e, com isto, conseguem manter constante o eritron, o valor do IPR. Nessa situação fisiológica, o IPR tende a ser em torno de 1, ou seja, há um equilíbrio entre a produção e a destruição. Valores de IPR acima de 3 indicam um aumento da atividade da medula óssea, o que significa que a destruição é maior que a capacidade de produção da medula óssea, mas que, ainda assim, a medula é funcional. Esse quadro hematológico indica que o paciente tem uma anemia hemolítica instalada ou em instalação, e o problema está na sobrevida eritrocitária, que está diminuída por uma destruição intra ou extravascular aumentada. O IPR não indica a intensidade de hemólise, que deve ser medida pela dosagem da bilirrubina indireta (hemólise extravascular) ou pela presença da hemoglobina na urina (hemólise intravascular). Quando o paciente apresenta um IPR acima de 3, mas não tem anemia, o quadro hematológico é de uma hemólise crônica compensada, o que pode ser observado

em talassemias ( $\beta$  ou  $\alpha$  talassemia menores), quadros que são acompanhados de microcitose e hipocromia. Valores de IPR abaixo de 3 ou 2, sem sinais de hemólise, podem significar anemia não hemolítica. O mesmo quadro hematológico com valores de IPR abaixo de 2 ou 1 também podem apontar anemia não hemolítica. Valores de IPR abaixo de 3, associados a sinais de hemólise discretos, podem indicar hemólise compensada. Quando há sinais de hemólise evidentes e o IPR está baixo, muitas vezes, abaixo de 1, deve-se pensar em crise de hemólise com esgotamento da capacidade de produção da medula óssea.

Para exemplificar o uso das correções, tem-se o exemplo do resultado de um eritrograma apresentado a seguir:

- RBC =  $4,03 \cdot 10^6$
- HGB = 10,8 g/dL
- HCT = 29%
- VCM = 73 fL
- HCM = 26,8 pg
- CHCM = 37,2%
- RDW = 27%

**Contagem manual dos reticulócitos:** em 15 campos com aproximadamente 70 eritrócitos por campo (1000 eritrócitos), foram encontrados 90 reticulócitos, ou seja, 9%. Pelos dados do eritrograma, é necessário aplicar a CCR, calcular a contagem absoluta e o IPR.

$$\text{Cálculo da CCR} = 9\% \times 29/45 = 5,8\%$$

Corrigida a contagem percentual, calcula-se a contagem absoluta:

$$\text{Contagem absoluta} = 5,8\% \times 4.030.000/100 = 233.740 \text{ reticulócitos/mL}$$

Para obtenção do IPR, divide-se a CCR pelo tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico que tem como base o valor do VG (**Quadro 6.12**). Portanto, neste caso:

$$\text{IPR} = \frac{5,8\%}{2} = 2,9$$

Pode-se concluir, com esses dados, que a medula desse paciente está produzindo células aproximadamente três vezes acima de sua capacidade normal, o que indica um processo hemolítico.

A definição de anemia hemolítica ou não hemolítica passa pela interpretação do IPR junto com o hemograma e com os valores relativo e absoluto dos reticulócitos. A contagem de reticulócitos não é a única maneira de se avaliar a hemólise. A policromatofilia (vista na extensão sanguínea) é



o primeiro sinal de hemólise que se evidencia no hemograma e está associada à reticulocitose. A presença de macrocitose (pseudomacrocitose), inclusões eritrocitárias (anel de Cabot, ponteados basófilos e corpúsculos de Howell Jolly), esquizócitos, codócitos e eritroblastos podem ser sinais de hemólise quando estão associados à policromatofilia. Esferócitos e drepanócitos também são alterações morfológicas dos eritrócitos que indicam hemólise.

### Considerações gerais

A importância da contagem de reticulócitos é óbvia em razão da relevância da informação que ela possui no entendimento dos mecanismos de instalação e curso das anemias. Porém, as limitações técnicas descritas neste capítulo, sem dúvida, diminuem a confiabilidade dessa contagem. Mesmo diante desse quadro, a realização da contagem de reticulócitos na rotina laboratorial deve ser estimulada, uma vez que estados hemolíticos ou casos de hipofunção medular, mesmo na técnica manual, produzem contagens altas ou muito baixas dos reticulócitos, tornando-se informações valiosas para o diagnóstico de suas causas. Esforços por parte dos laboratórios devem ser realizados, principalmente no treinamento dos profissionais que realizam a técnica, focando nos critérios de identificação e no número mínimo de eritrócitos contados. Divulgar as limitações que o teste possui entre os clínicos que interpretam essa contagem é outra maneira de otimizar seu uso na rotina médica. O laudo da contagem de reticulócitos, quando necessário, deve conter a contagem absoluta e corrigida além do IPR, o que melhora as informações a respeito do teste.

### Contagem automatizada de reticulócitos

No início da década de 1950, foi publicado um novo método para a contagem de reticulócitos usando como corante um fluorocromo.<sup>14</sup> Com o advento dos citômetros de fluxo comerciais na década de 1970, várias outras técnicas usando a fluorescência foram publicadas com o intuito de melhorar a precisão da contagem de reticulócitos. O uso de fluorocromos RNA específicos nesses citômetros apresentaram diversas vantagens sobre a contagem manual, considerando o maior número de células contadas, a eliminação do aspecto subjetivo da morfologia, além da possibilidade da determinação da “idade” dos reticulócitos, que pode ser definida pela quantidade de RNA na célula. Entre

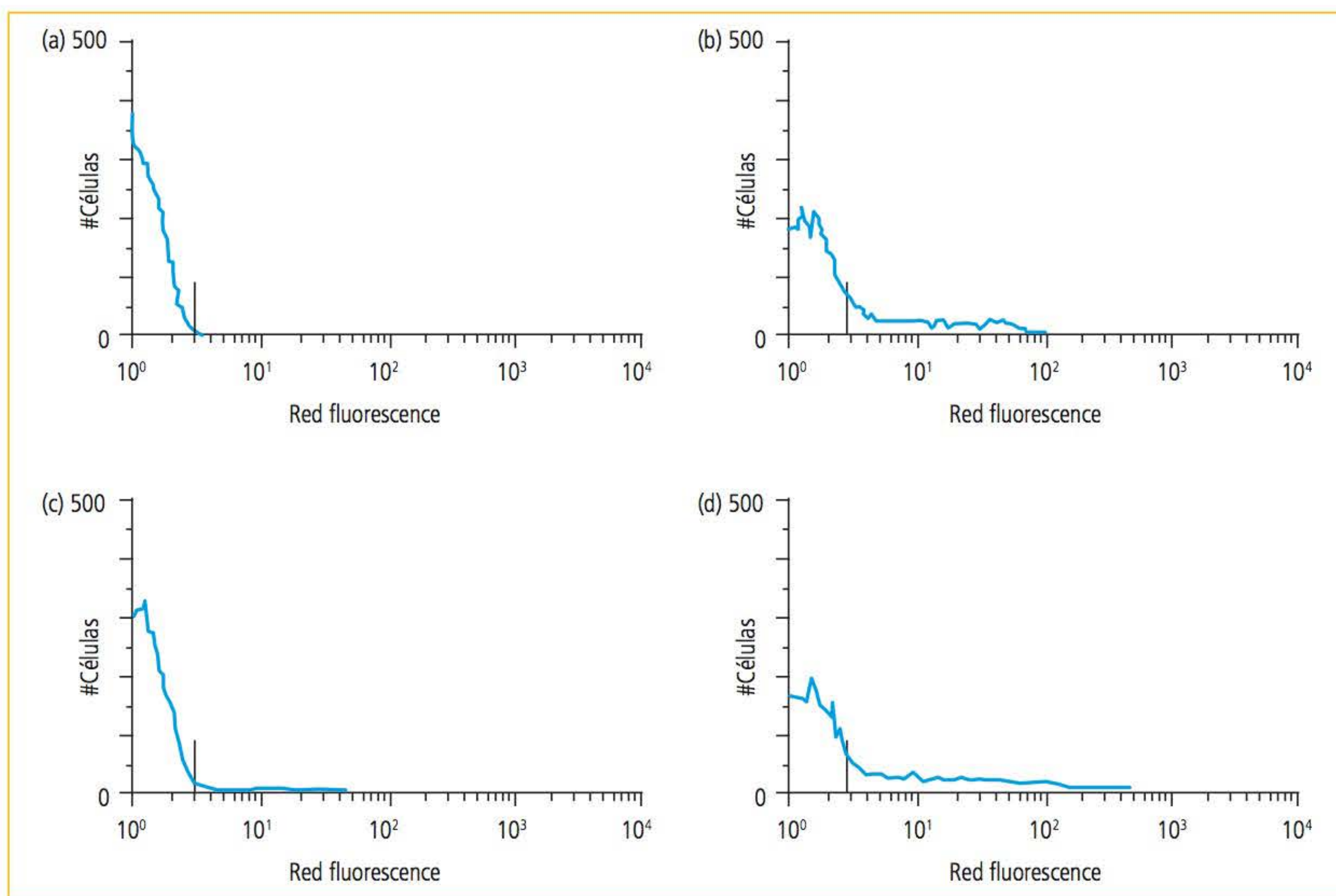
as desvantagens na contagem de reticulócitos com o uso de fluorocromos destaca-se a interferência dos eritroblastos e inclusões eritrocitárias, além do elevado custo para a implantação desses equipamentos na rotina laboratorial.

Os citômetros de fluxo, como o Becton Dickinson FACScan™ ou o Coulter® EPICS XL, são equipamentos de uso geral que podem realizar a contagem de reticulócitos. Nesses equipamentos, os fluorocromos são misturados à amostra de sangue e, após um período de incubação, o número de reticulócitos é determinado. Entre os fluorocromos mais usados destacam-se o brometo de etídio, auramina, proflavina, acridina laranja, tiazol laranja e azul de metileno. A **Figura 6.39** ilustra a contagem de reticulócitos realizada pelo citômetro Retic-COUNT™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View). Apesar da indiscutível melhora na sensibilidade e precisão que esses equipamentos trouxeram à contagem de reticulócitos, a utilização desses citômetros de fluxo na rotina laboratorial possui custo elevado de manutenção, além da necessidade de treinamento específico para a sua utilização, o que desencoraja a maioria dos laboratórios a adotar o método para a contagem de reticulócitos.

A introdução de analisadores hematológicos que realizam, além da contagem global de células sanguíneas, a contagem de reticulócitos tornou mais acessível o uso da contagem automatizada na rotina laboratorial. A Beckman Coulter® foi o primeiro fabricante a fornecer a contagem de reticulócitos nos modelos STKS™ e MAXM™. Utilizando como corante o azul de metileno e a tecnologia VCS (impedância, condutividade e dispersão de luz), esses equipamentos fornecem, além da contagem percentual, a contagem absoluta e o índice de maturação dos reticulócitos. A linha Sysmex® R-1000, foi o primeiro modelo fabricado pela TOA (Kobe, Japão) para a contagem de reticulócitos que utiliza como corante a auramina O, que cora o RNA do reticulócito, classificando-o de acordo com o grau de fluorescência emitida. A ABX (Montpellier, França), por intermédio do modelo ABX Pentra 120 Retic, utiliza o tiazol laranja (*orange tiazole*) como agente fluorescente, analisando cerca de 32 mil células para determinar os parâmetros reticulocitários.

A Linha Cell-Dyn da Abbott®, nos modelos 3500 e 3700, utiliza o azul de metileno, com fase manual (incubação) antes da contagem automatizada,





**FIGURA 6.39** Histogramas fornecidos pelo citômetro Retic-COUNT™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View). Contagens de reticulócitos nos histogramas de células: (a) 0,05% (pouca fluorescência emitida); (b) 4,3%; (c) 15,6% e (d) 24,3% (aumento da fluorescência emitida).<sup>10</sup>

fornecendo o índice de maturação dos reticulócitos (IRF). No Modelo Cell-Dyn 4000, o marcador utilizado (CD4K530) apresenta excelente correlação quando comparado com citômetros de fluxo que utilizam o *orange tiazole* como fluorocromo.<sup>15</sup> Com método totalmente automatizado (sem fase manual), o modelo Cell-Dyn Sapphire determina o IRF pelo uso de corante fluorescente de cor verde, emitindo luz a 530 nm.

Os equipamentos fornecidos pela Siemens® e representados pela Roche Diagnostics® e a linha Sysmex® fornecem, além da contagem de reticulócitos, novos parâmetros reticulocitários. Os modelos Advia 120 e 2120 (oxazina 750) liberam parâmetros de maturação em seus resultados de reticulócitos, além de informações a respeito de tamanho e quantidade de hemoglobina dessas células. Utilizando a polimetina como corante fluorescente, os modelos XE 2100, XT 2000i, XE 5000 e XT 4000i da Sysmex® também fornecem parâmetros extras a respeito dos reticulócitos. Essas novas informações podem ser incorporadas ao chamado reticulocitograma automatizado. A **Tabela 6.5** ilustra alguns equipamentos

que fornecem estes novos parâmetros relacionados aos reticulócitos.

### Uso do IRF e as frações de imaturidade dos reticulócitos

O IRF (do inglês *immature reticulocyte fraction*) equivale aos reticulócitos que possuem fluorescência média ou alta, ou seja, reticulócitos imaturos. Esse parâmetro é fornecido pela maioria dos analisadores hematológicos e sua elevação pode ser o primeiro sinal de sucesso na avaliação de transplantes de medula óssea. Com o mesmo propósito, a classificação da imaturidade dos reticulócitos em três populações distintas, de acordo com a sua quantidade de RNA (baixa, intermediária e alta fluorescência), pode melhorar as informações a respeito do funcionamento da medula óssea. Em estados hemolíticos, os reticulócitos imaturos elevam-se proporcionalmente à contagem global de reticulócitos, porém, nas diseritropoieses, como na leucemia mieloide aguda, a imaturidade dos reticulócitos aumenta, apesar da contagem total de reticulócitos estar normal ou até mesmo reduzida.<sup>16</sup>



TABELA 6.5 Equipamentos, tecnologia e parâmetros fornecidos para análise de reticulócitos			
EQUIPAMENTO	MÉTODO	CORANTE	PARÂMETROS
Advia® 120 Advia® 2120	Absorbância e dispersão de luz	Oxazina 750	IRF L-RET% M-RET% H-RET% VCMr, CHr, CHCMr, RDWr, HDWr, CHDWr
XE 2100 XT 2000I	Fluorescência e dispersão de luz	Polimetina	RET%, RET#, IRF RET Hb IPR
XE 5000 XT 4000I	Fluorescência e dispersão de luz	Polimetina	RET%, RET#, IRF, RET-HE, IPF
PENTRA DX 120	Impedância e fluorescência	Tiazol laranja	IRF, MRV, RETH%, RETM%, RETL%

IRF, fração de reticulócitos imaturos; RET Hb/RET He, conteúdo de hemoglobina no reticulócito; IPF, índice de produção reticulocitária; VCMr, volume reticulocitário médio; CHr, conteúdo de hemoglobina do reticulócito; CHCMr, concentração de hemoglobina corpuscular média do reticulócito; RDWr, RDW do reticulócito; HDWr, variação do CHr; CHDWr, variação da CHCMr; L-RET%/ RETL%, reticulócitos de baixa fluorescência (maduros); M-RET%/ RETM%, reticulócitos de média fluorescência; H-RET%/ RETH%, reticulócitos de alta fluorescência (imaturos).

O uso desses parâmetros de imaturidade dos reticulócitos devem ser avaliados com critérios bem definidos, principalmente com relação ao valor de normalidade a ser utilizado. Cada laboratório que realiza a contagem de reticulócitos deve estabelecer seu próprio valor de normalidade, tendo em vista as variações metodológicas que os analisadores apresentam. A **Tabela 6.6** apresenta os valores de normalidade publicados por diversos autores com relação ao IRF obtidos em vários modelos de analisadores hematológicos.

TABELA 6.6 Valores de normalidade do IRF. Valores obtidos em diferentes equipamentos e com variação do tamanho amostral			
AUTOR	TAMANHO AMOSTRAL	IRF	EQUIPAMENTO
Banfi (46)	n = 73	0,19-0,42	Beckman Coulter LH 750
Noronha (47)	n = 50	0,01-0,18	Sysmex XE 2100
Van den Bossche (48)	n = 317	0,14-0,35	Cell-Dyn 4000
Butarello (49)	n = 225	0,15-0,35 0,20-0,37 0,06-0,23 0,04-0,25 0,05-0,21	Cell-Dyn 4000 Gen S Pentra DX 120 Advia 120 Sysmex XE 2100

Estudo realizado por Chang e Kass<sup>17</sup> avaliou o uso do IRF em diversos quadros de anemias.

Utilizando como valor de corte do IRF em 0,23, o IRF apresentou boa correlação entre o IRF e o IPR (índice de produção reticulocitária) tanto em condições de hipofunção da medula óssea quanto nas anemias regenerativas, como nas anemias hemolíticas.

A avaliação da resposta da medula óssea também pode ser avaliada pelas frações de imaturidade dos reticulócitos. O aumento da porcentagem de reticulócitos imaturos pode predizer a recuperação hematopoiética em várias situações, como no tratamento de anemias aplásticas, ou na recuperação de tratamentos quimioterápicos, antes mesmo da elevação da contagem absoluta de reticulócitos, de neutrófilos e de plaquetas.<sup>2</sup> A **Tabela 6.7** mostra o comportamento das frações imaturas dos reticulócitos em paciente com diagnóstico de anemia megaloblástica, por deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, que, após o início do tratamento para reposição vitamínica, foi acompanhado por meio de hemograma, contagem de plaquetas e perfil reticulocitário.

Após 5 dias de tratamento, a fração de maior imaturidade elevou-se drasticamente, o que indica que a medula óssea incorporou a vitamina B<sub>12</sub> fornecida pelo tratamento. A contagem de reticulócitos (%) eleva-se ao nível máximo entre o sexto e sétimo dia, período em que a fração HFR já declina em cerca de 3 vezes. Após o quinto dia, o perfil das frações altera-se discretamente, ao contrário



**TABELA 6.7** Perfil dos parâmetros fornecidos pelo hemograma e pelas frações de imaturidade dos reticulócitos durante o tratamento de anemia megaloblástica

	SEM TRATAMENTO	TRATAMENTO 5 DIAS	TRATAMENTO 6 DIAS	TRATAMENTO 7 DIAS	TRATAMENTO 14 DIAS
Eritrócitos 10 <sup>6</sup> /μL	1,58	2,74	2,50	2,62	2,48
Hemoglobina (g/dL)	4,7	8,4	8,0	8,4	8,7
Hematócrito	13,1	23,4	22,7	24,6	24,7
Plaquetas	71.000	60.000	53.000	91.000	346.000
RET %	1,72	6,26	13,1	12,5	5,8
LFR – RETL%	77,8	28,3	63,8	78,1	80,4
MFR – RETM%	17,6	25,6	23,9	14,0	12,9
HFR – RETH%	4,6	46,1	12,3	7,9	6,7

da contagem percentual. A contagem de plaquetas apresenta resposta apenas após 14 dias de tratamento, enquanto os parâmetros do eritrograma mantêm-se constantes nesse período.

O que deve ser ressaltado por meio desse quadro é a rápida resposta que os parâmetros de maturidade dos reticulócitos possuem em relação aos parâmetros tradicionais fornecidos pelos hemogramas nos casos de tratamento das anemias, o que é efetivo na avaliação da terapia escolhida.

### Novos parâmetros reticulocitários – uso clínico

Como descrito no **Quadro 6.11**, os equipamentos Advia 120 e Advia 2120 apresentam parâmetros relacionados ao tamanho (VCMr) e à variação do tamanho dos reticulócitos (RDWr), além de informação relacionadas ao conteúdo de hemoglobina nessas células (CHr, CHCMr, HDWr e CHDWr). O volume e a concentração de hemoglobina em cada reticulócito são determinados de maneira independente de acordo com a dispersão de luz em dois ângulos distintos. A Sysmex®, nos modelos XE 2100 e XE 5000, estabelece um parâmetro similar ao CHr da Siemens®, denominado Ret-He, que é determinado pela dispersão de luz dos reticulócitos após a coloração com polimetina. A CHr e o Ret-He têm o mesmo propósito de uso clínico, ou seja, informar o conteúdo de hemoglobina no reticulócito.<sup>18</sup>

Esses parâmetros têm sido usados para avaliação do tratamento de anemias carenciais, como nas anemias ferroprivas e megaloblásticas, além da resposta da medula óssea frente a agentes estimuladores de sua atividade, como a eritropoietina. No caso do tratamento da anemia ferro-

priva, o conteúdo de hemoglobina no reticulócito (CHr ou Ret-He) reflete como o ferro foi utilizado pela medula óssea para a produção de eritrócitos em poucos dias. Além disso, esse parâmetro pode ser usado para a identificação de estados iniciais da deficiência de ferro em crianças, antecipando tratamentos com ferro e impedindo a implantação da deficiência em estágios avançados.<sup>19</sup> A **Figura 6.40** exemplifica o comportamento da CHr no tratamento de uma deficiência de ferro em paciente submetido à hemodiálise. Sem tratamento, a microcitose e o pouco conteúdo de hemoglobina no reticulócito são evidentes, o que comprova a falta de ferro nesse estágio. Após quatro dias de tratamento, a CHr alcança o conteúdo hemoglobínico normal (26-32 pg), ou seja, nesse curto período de tempo, a informação prestada por esse parâmetro é que o tratamento foi eficaz, ou seja, o ferro contido no tratamento foi incorporado com sucesso na produção de novas células normais. Essa resposta rápida tem atribuído a esse parâmetro reticulocitário grande importância na rotina médica.

### Valores de referência do reticulocitograma automatizado

Pela grande variedade de equipamentos que são comercializados atualmente, existem muitas variações nos valores de referência utilizados para a contagem automatizada de reticulócitos. Como qualquer outro teste laboratorial, cada laboratório deve estabelecer seus próprios limites de normalidade, respeitando a característica da população a ser atendida e a tecnologia do equipamento utilizado. Para o entendimento dessa situação, a **Tabela 6.8** descreve alguns estudos que estabeleceram



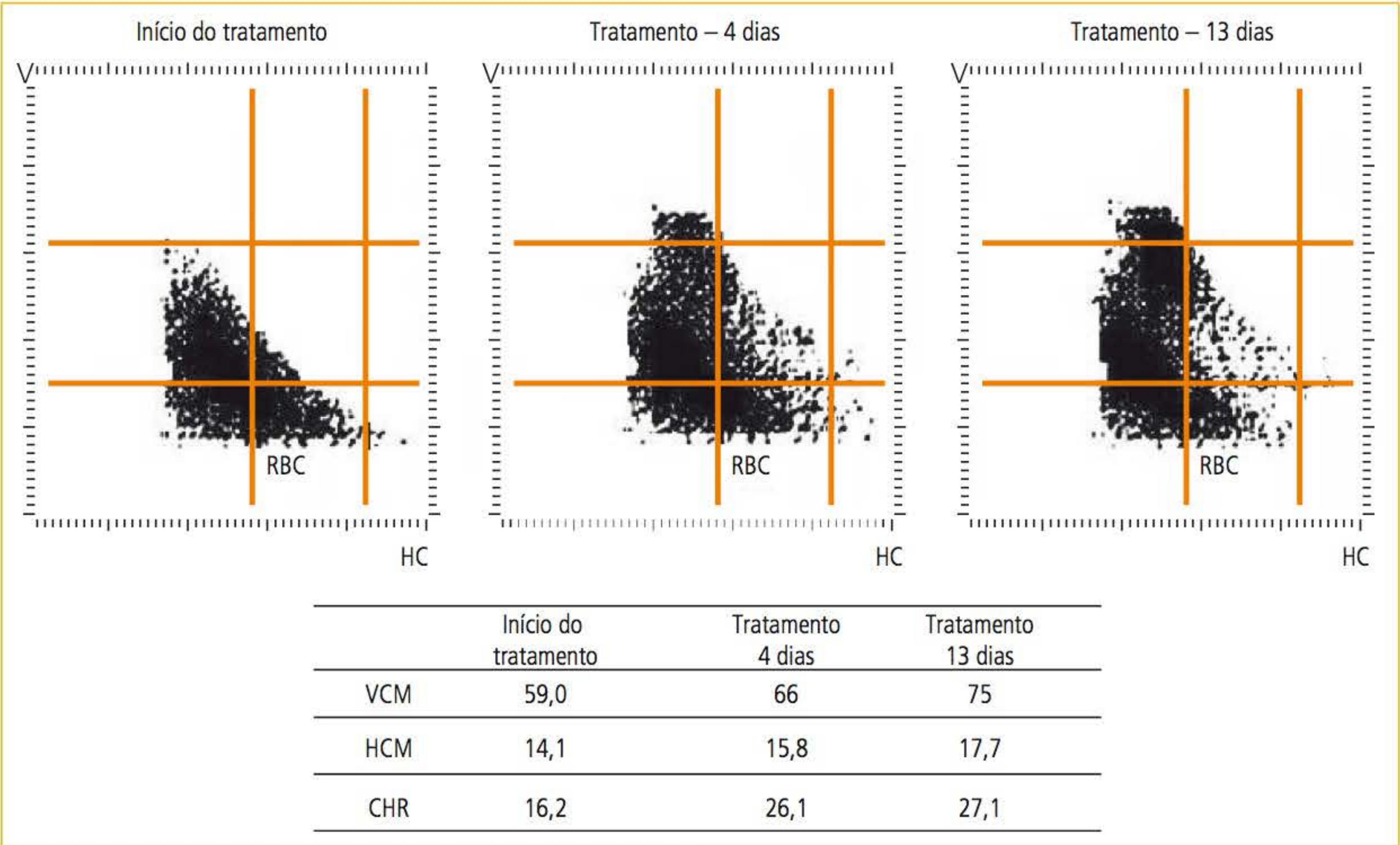


FIGURA 6.40 Comportamento da CHR no tratamento de eficiência de ferro.

TABELA 6.8 Valores de normalidade de CHr, RET He, VCMr e a contagem absoluta de reticulócitos em alguns estudos publicados				
	CHr (pg)	RET-He (pg)	VCMr	Ret absoluta (10 <sup>9</sup> /L)
Garcia, (53) n = 55	29,2-33,6	30,5-35,5		
Bovy, (54) n = 57	32,2-32,8		103,3-109,9	38,3-65,1
d’Onofrio, (55) n = 64	25,9-30,6		103,2-126,3	
Piva, (56) n = 126	30,2-35,9	30,7-37,0	98,0-115,0	22,0-85,0 (Advia 120) 27,0-90,0 (Sysmex XE 2100)
Canals, (57) n = 196		30,2-36,7		

valores de referência para diferentes parâmetros reticulocitários.

Considerações finais

A contagem de reticulócitos é, sem dúvida, importante ferramenta diagnóstica na avaliação da atividade da medula óssea. Devido às limitações técnicas, a contagem manual de reticulócitos tem perdido importância na rotina laboratorial, dando lugar à contagem automatizada de reticulócitos. Evidentemente, a contagem automatizada permite a avaliação de um número maior de células, proporcionando, consequentemente,

maior segurança e precisão ao teste. Devido à grande variedade de agentes utilizados na identificação dos reticulócitos e às diferentes metodologias empregadas nos diversos analisadores atualmente comercializados, existe a necessidade de padronização dos limites de referência, além do aprofundamento nos estudos sobre o uso dos novos parâmetros reticulocitários na rotina médica.

CLASSIFICAÇÃO MORFOFIOSOLÓGICA

A classificação fisiológica das anemias informa se a anemia em questão é hemolítica (regenerati-



va ou com atividade de medula óssea) ou não hemolítica (arregenerativa ou sem atividade de medula óssea) e leva em conta a policromatofilia, reticulocitose e os demais sinais de hemólise. Agora, dentro da classificação morfológica, pode-se incluir a classificação fisiológica e tem-se a classificação morfofisiológica das anemias. Essa classificação será discutida em detalhes no próximo capítulo.

## REFERÊNCIAS

1. Barth D, Hirschmann JV. Anemia. In: Tkachuk DC, Hirschmann JV. Wintrobe: atlas colorido de hematologia. Rio de Janeiro: Revinter; 2010.
2. Bain JB. Valores de referência. In: Bain JB. Células sangüíneas: um guia prático. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
3. Vives Corrons JL. Introduccion al estudio de la anemia: aspectos generales del diagnóstico. In: Sanssabrafen J. Hematologia clinica. 3. ed. Madrid: Mosby; 1994.
4. Camarinha GC, Medeiros Jr N, Lopes RM. Controle interno. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: Controllab; 2011. v. 2.
5. Guthrie C, Abelson J. Organization and expression of tRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Strathern J, Jones E, Broach J, editors. The molecular biology of the yeast *saccharomyces*: metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor: Harbor Laboratory; 1982.
6. Henneberg R, Silva P, Nascimento A, Monteiro M, Pedrassani C, Emmer A. Estudo comparativo de parâmetros de eritograma do Coulter STKS e do Sysmex XE-2100D. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2011;45(4):757-62.
7. Spezia J, Nascimento A, Silva P, Kopp R, Henneberg R. Avaliação dos índices hematimétricos obtidos pelos contadores hematológicos Cell-Dyn 3200 e ADVIA 60. *Laes&Haes*. 2013;34:120-6.
8. Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Médica Paulista; 2007.
9. Bessman JD, Gilmer PR Jr, Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol*. 1983;80(3):322-6.
10. Riley RS, Ben-Ezra JM, Goel R, Tidwell A. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J Clin Pathol Anal*. 2001;15(5):267-94.
11. Corberand JX. Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther*. 1996;38(6):487-94.
12. Brecher G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am J Clin Pathol*. 1949;19(9):895.
13. Koepke JF, Koepke JA. Reticulocytes. *Clin Lab Haematol*. 1986;8(3):169-79.
14. Kozenow W, Mai H. Fluorescence microscopy of blood cells. *Z Kinderheikd*. 1952;70.
15. Davis BH, Bigelow NC, Van Hove L. Immature reticulocyte fraction (IRF) and reticulocyte counts: comparison of Cell-Dyn 4000, Sysmex R-3000, thiazole flow cytometric, and manual counts. *Labs Hematol*. 1996;2:144-50.
16. Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Iri H, Ikeda Y, et al. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *J Clin Pathol*. 1994;47(8):736-9.
17. Chang CC, Kass L. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol*. 1997;108(1):69-73.
18. Thomas L, Franck S, Messinger M, Linssen J, Thome M, Thomas C. Reticulocyte hemoglobin measurement--comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1193-202.
19. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA*. 1999;281(23):2225-30.

## Leituras sugeridas

- Banfi G, Mauri C, Morelli B, Di Gaetano N, Malgeri U, Melegati G. Reticulocyte count, mean reticulocyte volume, immature reticulocyte fraction, and mean spheroid cell volume in elite athletes: reference values and comparison with the general population. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(5):616-22.
- Buttarelli M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuio E, et al. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol*. 2001;115(1):100-11.
- Noronha JF, Grotto HZ. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in patients with iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(2):195-7.
- Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A, Neeis H, et al. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(1):69-73.



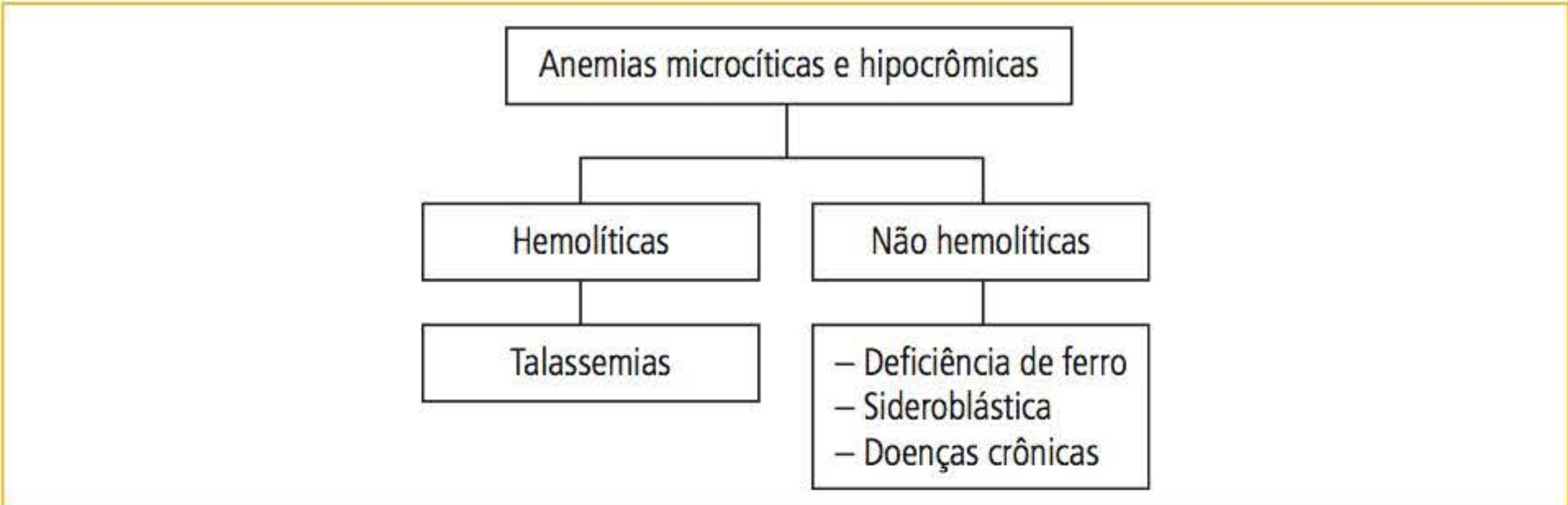
# SÉRIE VERMELHA – ERITROGRAMA

## CLASSIFICAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DAS ANEMIAS

A classificação fisiológica das anemias informa se a anemia em questão é hemolítica (regenerativa ou com atividade de medula óssea) ou não hemolítica (arregenerativa ou sem atividade de medula óssea) e leva em conta a policromatofilia, reticulocitose e os demais sinais de hemólise. No entanto, dentro da classificação morfológica, pode-se incluir a classificação fisiológica e tem-se a classificação morfofisiológica das anemias.

### ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS

As anemias microcíticas e hipocrômicas podem ser classificadas em hemolíticas e não hemolíticas, conforme mostra a **Figura 7.1**.



**FIGURA 7.1** Classificação morfofisiológica das anemias microcíticas e hipocrômicas.

### ANEMIA MICROCÍTICA E HIPOCRÔMICA NÃO HEMOLÍTICA: ANEMIA FERROPRIVA

A deficiência de ferro é uma das deficiências nutricionais mais comuns, responsável por anemia, especialmente em crianças e mulheres adultas, em todo o mundo. O interesse clínico no estudo da doença reside em várias frentes, principalmente (1) no diagnóstico precoce da deficiência de ferro subclínica, de modo a prevenir suas complicações sistêmicas; (2) na identificação da anemia por deficiência de ferro causada por alimentação incorreta, má-absorção e sangramentos; e (3) especialmente em ambientes hospitalares, na distinção entre anemia por deficiência de ferro e outras condições clínicas associadas, tais como anemias acompanhadas de infecções, processos inflamatórios e câncer, as quais são denominadas comumente como anemias de doenças crônicas.<sup>1</sup>

O ferro é um metal de transição que ingressa no organismo unicamente pela alimentação e participa não somente do transporte de oxigênio (hemoglobina) e elétrons (citocromos), mas também como catalisador de muitas reações necessárias para o desenvolvimento, diferenciação e proliferação celulares. A hemóstase



do ferro no organismo depende do equilíbrio entre a absorção intestinal e o controle das reservas, sendo que a eritropoiese tem papel fundamental na manutenção desse equilíbrio.<sup>1,2</sup>

A maioria das anemias microcíticas caracteriza-se pela síntese deficiente de hemoglobina, a qual está ligada à deficiência de ferro ou ao desequilíbrio na ingestão do ferro. A diferenciação da anemia por deficiência de ferro do traço talassêmico e das anemias de doenças crônicas deve ser realizada para o correto tratamento dessas condições.

Em geral, os marcadores bioquímicos que avaliam o metabolismo de ferro baseiam-se na dosagem de ferro sérico, na capacidade de transporte de ferro, no índice de saturação, na ferritina e, mais recentemente, na avaliação dos receptores solúveis de transferrina. O diagnóstico de deficiência de ferro é feito com base na presença de anemia, na morfologia dos eritrócitos (hipocromia e microcitose) em conjunto com baixas concentrações de ferritina e aumento dos receptores de transferrina.<sup>1</sup>

Estruturalmente, o ferro do organismo não se encontra na forma livre; ele sempre está ligado a outras moléculas, tais como ao grupamento heme ou a inúmeras enzimas. No processo de reutilização do ferro, existe um constante mecanismo de movimentação por diferentes compartimentos, sendo os mais importantes o eritrocitário (hemoglobina), o compartimento de reserva (ferritina e hemossiderina) e o compartimento de transporte (transferrina). O funcionamento desse sistema metabólico depende da ação coordenada de três proteínas: a transferrina (transporte), o receptor de transferrina (utilização) e a ferritina (estoque).<sup>2</sup> Portanto, a determinação laboratorial desses parâmetros são importantes para a compreensão do metabolismo do ferro, o qual facilita o diagnóstico das doenças correlacionadas, tais como as anemias de doenças crônicas e as hemoglobinopatias.

Quando não ocorre uma perda rápida e grande de sangue, a deficiência de ferro é o resultado final de um longo período negativo na hemóstase de ferro. Quando as concentrações de ferro começam a diminuir, uma sequência de eventos instala-se. Primeiro, os estoques de ferro nos hepatócitos, nos macrófagos, no baço e na medula óssea diminuem, com consequente redução do ferro plasmático que, por sua vez, dificulta o suprimento de ferro na medula óssea, tornando inadequada a produção de hemoglobina.

Essa progressão de eventos corresponde a três estágios distintos. O primeiro estágio, também chamado de deficiência de ferro pré-latente, representa uma diminuição nos estoques sem redução dos níveis plasmáticos de ferro. Nesta fase, a concentração de hemoglobina permanece acima dos limites mínimos de normalidade. No segundo estágio, algumas anormalidades bioquímicas podem ser observadas, incluindo a redução da saturação de transferrina, o aumento da capacidade de transporte de ferro e a elevação da protoporfirina livre eritrocitária.<sup>3</sup> Finalmente, no terceiro estágio, a concentração de hemoglobina diminui a níveis abaixo dos limites preconizados e a anemia se instala.<sup>4</sup>

O diagnóstico laboratorial da anemia por deficiência de ferro exige, em primeiro lugar, a confirmação da depleção do ferro para que seja possível investigar a provável causa (diagnóstico etiológico). Atualmente, existem inúmeras provas laboratoriais para confirmação da depleção de ferro, sendo esses testes classificados de acordo com sua especificidade em dois grandes grupos: testes diretos e indiretos. Apesar da maior especificidade, as provas diretas não são utilizadas rotineiramente por serem consideradas invasivas e desconfortáveis para o paciente.<sup>2</sup> Por outro lado, as provas indiretas são mais acessíveis ao paciente e amplamente utilizadas na rotina laboratorial; porém, possuem menor especificidade, especialmente quando associada à ferropenia coexiste outra condição clínica, como infecções e processos inflamatórios.<sup>5</sup>

## Características laboratoriais da deficiência de ferro

### Hemograma

Como em qualquer anemia, a conduta diagnóstica inicial consiste na observação morfológica da extensão sanguínea, na determinação das constantes corpusculares (volume corpuscular médio [VCM], hemoglobina corpuscular média [HCM], concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM] e amplitude de anisocitose [RDW, do inglês *red cell distribution width*]) e na contagem de reticulócitos.<sup>2</sup> Na deficiência de ferro, uma anemia normocítica-normocrômica com anisocitose precede o desenvolvimento de anisocromia, hipocromia e microcitose, sendo que as alterações não costumam ser evidentes até a queda da hemoglobina a níveis abaixo de 10 a 11 g/dL, quando se desenvolve o quadro característico.<sup>6</sup> O grau de



mudança das constantes corpusculares parece ser proporcional à duração e gravidade da anemia, sendo que, em deficiências de curta duração, esses índices não se alteram.

Nos contadores hematológicos, a primeira evidência de deficiência de ferro pode ser observada pelo aumento do RDW, indicando uma anisocitose que precede a anemia. A alteração observada em seguida é a queda da hemoglobina, da contagem de eritrócitos e do hematócrito, seguida pela queda do VCM e da HCM. Em equipamentos que utilizam a impedância elétrica como método de contagem, a HCM abaixo de 26 pg mostrou ser um indicador mais sensível à falta de ferro do que um VCM abaixo de 80 fL.<sup>7</sup> A CHCM baixa é um indicador de deficiência de ferro quando calculada a partir do micro-hematócrito e da hemoglobina, ou quando medida pela dispersão de luz em analisadores mais recentes. Porém, quando medida pela impedância elétrica, é pouco sensível devido à deformabilidade e à viscosidade do eritrócito durante o processo de contagem.<sup>6</sup> No diagnóstico diferencial da deficiência de ferro, do traço talassêmico e das anemias de doenças crônicas, o hemograma auxilia na distinção, mas o diagnóstico definitivo deve ser estabelecido por meio de exames específicos. O achado de codócitos e de ponteados basófilos favorece a hipótese de talassemia menor; a presença de anisocromia e eliptócitos indica deficiência de ferro, enquanto o aumento do *rouleaux*, assim como a presença de outros indicadores de inflamação, sugere anemia de doença crônica. O RDW é habitualmente mais elevado na deficiência de ferro, enquanto contagens elevadas de eritrócitos com VCM baixo aliado à hemoglobina normal ou discretamente baixa sugerem, fortemente, talassemia menor.

Com o advento da automação, principalmente em equipamentos que possuem a dispersão de luz como método de análise celular, novos parâmetros foram incluídos nos protocolos de diagnóstico de algumas doenças hematológicas, como é o caso da deficiência de ferro. Estes equipamentos fornecem histogramas de distribuição das células por volume e por concentração de hemoglobina, além de um gráfico no qual o volume é plotado no eixo das ordenadas e a concentração hemoglobínica, no eixo das abscissas.<sup>6</sup> Desta forma, tais equipamentos fornecem novos índices relacionados aos eritrócitos, tais como a porcentagem de células hipocrômicas e hiperocrômicas (HIPO e

HIPER), bem como a porcentagem de células microcíticas e macrocíticas (MICRO e MACRO).

O índice HIPO corresponde ao conteúdo de hemoglobina em cada eritrócito que contenha concentrações abaixo de 28 g/dL de hemoglobina, e subpopulações de células HIPO acima de 10% indicam uma eritropoiese deficiente de ferro.<sup>8</sup> Em razão do tempo de vida do eritrócito, esse índice é considerado um marcador tardio de uma eritropoiese com restrição de ferro, não tendo sensibilidade para informar rápidas variações da concentração de ferro. Valores de HIPO abaixo de 10% em associação com níveis baixos de ferritina podem indicar que o suprimento de ferro para a eritropoiese é suficiente para uma normal hemoglobinação do eritrócito, mesmo que os estoques estejam consideravelmente depletados.<sup>1</sup> Não há ainda um consenso sobre o limite mínimo da porcentagem de células hipocrômicas como definidor de uma deficiência funcional de ferro. Nos estudos já realizados, este valor pode variar entre 3,7% e 10%,<sup>9,10</sup> o que demonstra que mais estudos são necessários para a correta utilização desse parâmetro, por exemplo, na deficiência de ferro.

O índice MICRO tem sido utilizado como um importante marcador diagnóstico da  $\beta$ -talassemia heterozigótica, em que valores de MICRO acima de 20% são considerados indicativos da doença. A razão entre a porcentagem de células MICRO e HIPO tem sido considerada útil para esse diagnóstico; razões acima de 0,9 em conjunto com níveis de MICRO acima de 20% têm alta sensibilidade para o traço talassêmico.<sup>11</sup>

### Conteúdo de hemoglobina do reticulócito (CHr)

Os reticulócitos possuem um *turnover* na circulação mais rápido do que os eritrócitos maduros (1 a 2 dias vs. 120 dias), o que pode indicar que o reticulócito é um marcador mais sensível para avaliar a atividade eritropoiética. Com o advento de técnicas de citometria de fluxo, as determinações de várias características do reticulócito permitiram a obtenção de informações claras e objetivas a respeito da atividade eritroide nas anemias.<sup>8</sup> A maioria das contagens automatizadas de reticulócitos depende da capacidade de combinação de diversos fluocromos com o RNA do reticulócito. Os fluocromos podem também combinar-se com o DNA, tornando as células nucleadas fluorescentes, as quais são então detectadas por absorvância da luz ou por dispersão de luz.<sup>6</sup>



Após prévia mistura com os fluorocromos, os reticulócitos são diferenciados dos eritrócitos maduros, e a quantidade de luz absorvida é proporcional à quantidade de fluorocromo contida em cada reticulócito. Desse modo, além de perfazer a contagem global de reticulócitos, esses contadores também diferenciam e escalonam três tipos de reticulócitos: tipo I, os mais imaturos; tipo II, imaturidade intermediária; e tipo III, os mais maduros. Além disso, alguns analisadores detentores da tecnologia de dispersão a *laser* produzem parâmetros de volume reticulocitário (VCMr), concentração média de hemoglobina (CHCMr), variação do tamanho dos reticulócitos (RDWr) e conteúdo de hemoglobina do reticulócito (CHr).<sup>12</sup>

O CHr tem sido considerado o melhor parâmetro avaliador do *status* de ferro e o mais precoce marcador da resposta a terapia com ferro em pacientes hemodialisados.<sup>13</sup> Este parâmetro avalia de forma direta a concentração hemoglobínica em uma população recente de origem eritroide, permitindo a detecção de uma deficiência de ferro antes dos parâmetros tradicionalmente avaliados no eritrograma. O CHr pode demonstrar o sucesso de uma terapia com suplementação de ferro em aproximadamente quatro dias após o início do tratamento, o que é muito precoce, se comparado com os outros parâmetros hematológicos. Estudos feitos por d'Onofrio e colaboradores,<sup>11</sup> em uma população normal, demonstraram uma média para o CHr de 28,6+/- 1,6 pg. Valores de CHr abaixo de 26 pg são considerados indicativos de eritropoiese deficiente de ferro, tendo sensibilidade superior à ferritina, à saturação de transferrina e ao índice de eritrócitos hipocrômicos (HIPO).<sup>13</sup>

Cullen, em 1998, demonstrou que o CHr é um parâmetro de diagnóstico de deficiência funcional de ferro melhor que o HIPO, independentemente do limite mínimo do índice HIPO utilizado. Além disso, o CHr foi considerado por este autor como o marcador ideal para avaliação do metabolismo do ferro em paciente dialisados.

### Ferro sérico, capacidade de transporte de ferro, índice de saturação de transferrina e ferritina

Todos os testes que são comumente usados no *screening* da deficiência de ferro possuem significativas limitações.<sup>14</sup> O ferro sérico, a capacidade total de ligação de ferro (CTLF), o índice de saturação de transferrina e a ferritina são consideravelmente afetados por proteínas de fase aguda, o

que dificulta a sua interpretação clínica.<sup>5</sup> Além disto, esses testes nem sempre conseguem distinguir a anemia de doença crônica da anemia por deficiência de ferro, principalmente pelo fato de tanto a ferritina quanto a transferrina serem influenciadas por respostas de fase aguda, como nas inflamações.<sup>15</sup> Portanto, na maioria das rotinas laboratoriais, não há um teste com sensibilidade e especificidade suficientes para ser, de forma isolada, o marcador definitivo da deficiência de ferro. O uso combinado desses testes, geralmente, não melhora a eficiência diagnóstica, o que dificulta corretas interpretações dos seus resultados. Especialmente em pacientes hospitalizados, nos quais frequentemente coexistem complicações multifatoriais, a avaliação do metabolismo do ferro é ainda mais difícil.<sup>14</sup> Uma alternativa para o diagnóstico do estado do ferro é a hemossiderina na medula óssea (determinada pelo método de coloração de Perls); porém, o método é invasivo para o paciente, pois utiliza material proveniente de mielograma ou biópsia, o que limita muito sua utilização.<sup>16</sup>

A concentração de ferro no soro refere-se ao  $\text{Fe}^{+3}$  ligado à transferrina e não inclui qualquer ferro contido no soro como hemoglobina livre. Normalmente, devido a somente um terço dos locais de ligação para o ferro da transferrina estar ocupado por  $\text{Fe}^{+3}$ , a transferrina do soro tem considerável reserva de capacidade ligante de ferro, o que é chamado de capacidade total de ligação de ferro (CTLF). A CTLF é a medida da concentração máxima de ferro que as proteínas do soro, principalmente a transferrina, podem armazenar.<sup>17</sup> O índice de saturação da transferrina é obtido pela relação entre o ferro sérico e a CTLF.<sup>16</sup>

Muitos fatores influenciam o ferro sérico e a CTLF. A variação de um dia para o outro é bastante acentuada em pessoas saudáveis. Em geral, as concentrações de ferro são instáveis, sendo influenciadas pelas variações circadianas; a concentração de ferro é menor pela manhã quando comparada ao período da tarde, fator que deve ser avaliado quando da interpretação do teste.<sup>17</sup>

As principais fontes de erro nas dosagens de ferro e CTLF são a incompleta dissociação do ferro às proteínas ligantes; a perda do ferro em técnicas que utilizam a precipitação proteica; a incompleta dissociação do  $\text{Fe}^{+3}$  para  $\text{Fe}^{+2}$ , além de cuidados rígidos para assegurar que a vidraria, a água e os reagentes não estejam contaminados com ferro ambiental.<sup>18</sup> Além disso, a concentração



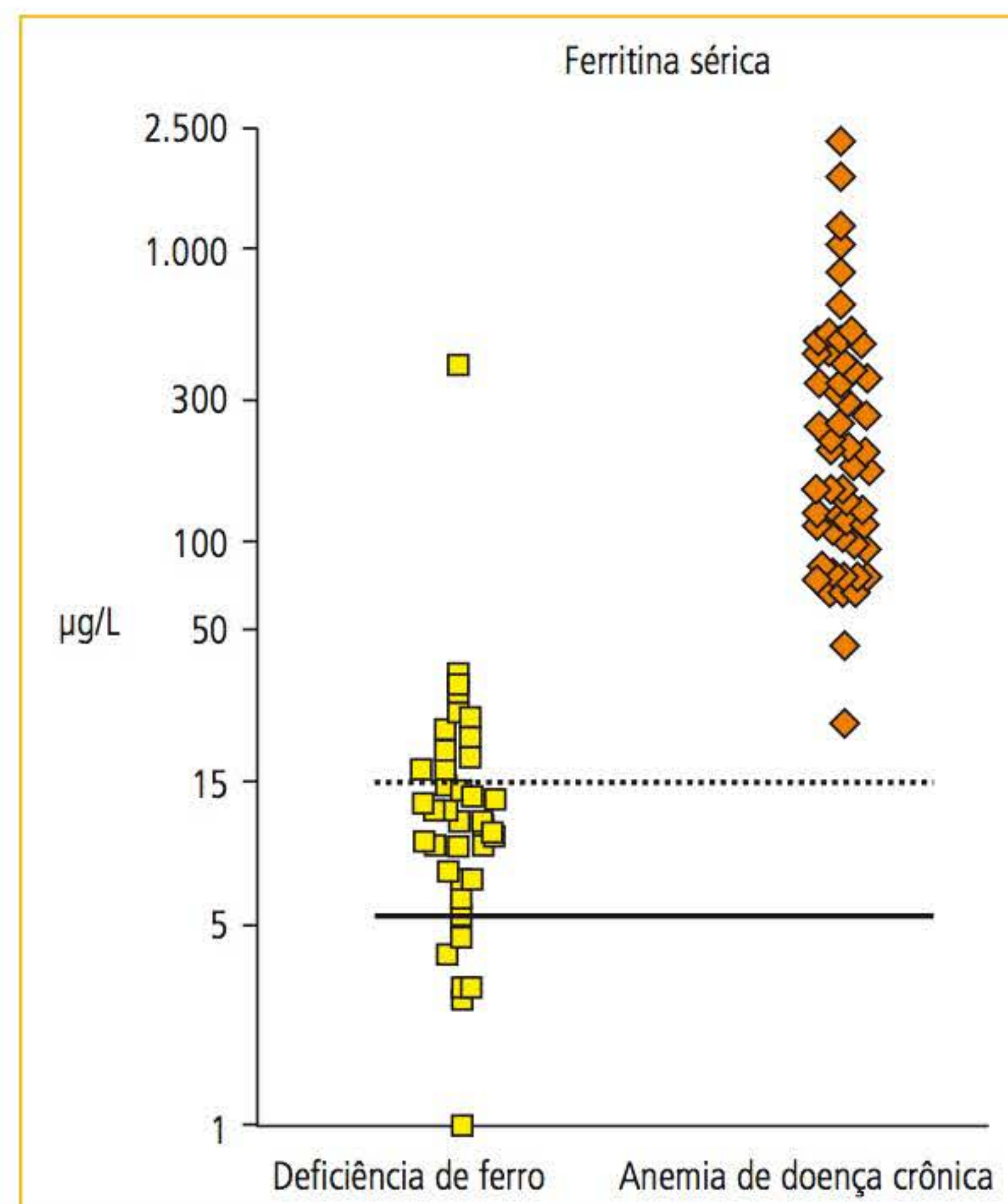
de ferro pode estar alterada na presença de processos infecciosos, podendo diminuir em poucas horas após o desencadeamento de uma infecção.<sup>16</sup> Em estudo realizado por Tietz e colaboradores,<sup>18</sup> compararam-se o método referendado pela ICSH e outros cinco diferentes métodos utilizados na rotina clínica, a maioria com a fase de precipitação de proteína. A baixíssima correlação entre os métodos alarmou os autores e os fez buscar um método alternativo que substituísse a dosagem do ferro sérico.

A CTLF sofre as mesmas influências fisiológicas e técnicas que a dosagem do ferro sérico, o que limita seu uso no diagnóstico da deficiência de ferro. A CTLF pode apresentar resultados baixos, mesmo nas situações de deficiência de ferro, em 25% dos casos, o que demonstra que o teste tem baixa especificidade.<sup>19</sup> Em função da reduzida especificidade e sensibilidade do ferro sérico e da CTLF, costuma-se considerar a relação entre as duas medidas, ou seja, o índice de saturação de transferrina (IS%). Esta determinação possui limitações semelhantes às dosagens que a originam, como, por exemplo, as variações na presença de infecções.<sup>16</sup>

Em um estudo realizado em 1.053 pacientes, utilizando a ferritina como padrão ouro para o diagnóstico de deficiência de ferro, 23% dos pacientes apresentaram baixos níveis de ferritina; porém, apenas 6% apresentaram, no seu perfil laboratorial, concentrações elevadas de CTLF e baixa porcentagem no índice de saturação de transferrina.<sup>20</sup> Burns e colaboradores<sup>14</sup> demonstraram a baixa eficiência (20,3%) da associação da dosagem do ferro e do índice de saturação de transferrina em um estudo que avaliou 301 pacientes anêmicos, comprovando a pequena utilidade dessas determinações na rotina médica.

A ferritina plasmática reflete os estoques corporais e as variações na quantidade de ferro no compartimento de armazenamento do metal. A ferritina declina precocemente no desenvolvimento da deficiência de ferro, muito antes das alterações observadas na concentração sanguínea da hemoglobina, do tamanho do eritrócito ou da concentração do ferro no soro. Desta maneira, a ferritina é um indicador sensível da deficiência de ferro, principalmente quando não há uma associação com alguma outra doença.<sup>17</sup> De todos os testes que podem avaliar uma deficiência de ferro,

a ferritina é o mais útil, e, invariavelmente, níveis baixos de ferritina indicam depleção nos estoques de ferro.



**FIGURA 7.2** Comparação do comportamento da ferritina na anemia por deficiência de ferro e nas anemias de doenças crônicas.

Fonte: Punnonen e colaboradores.<sup>5</sup>

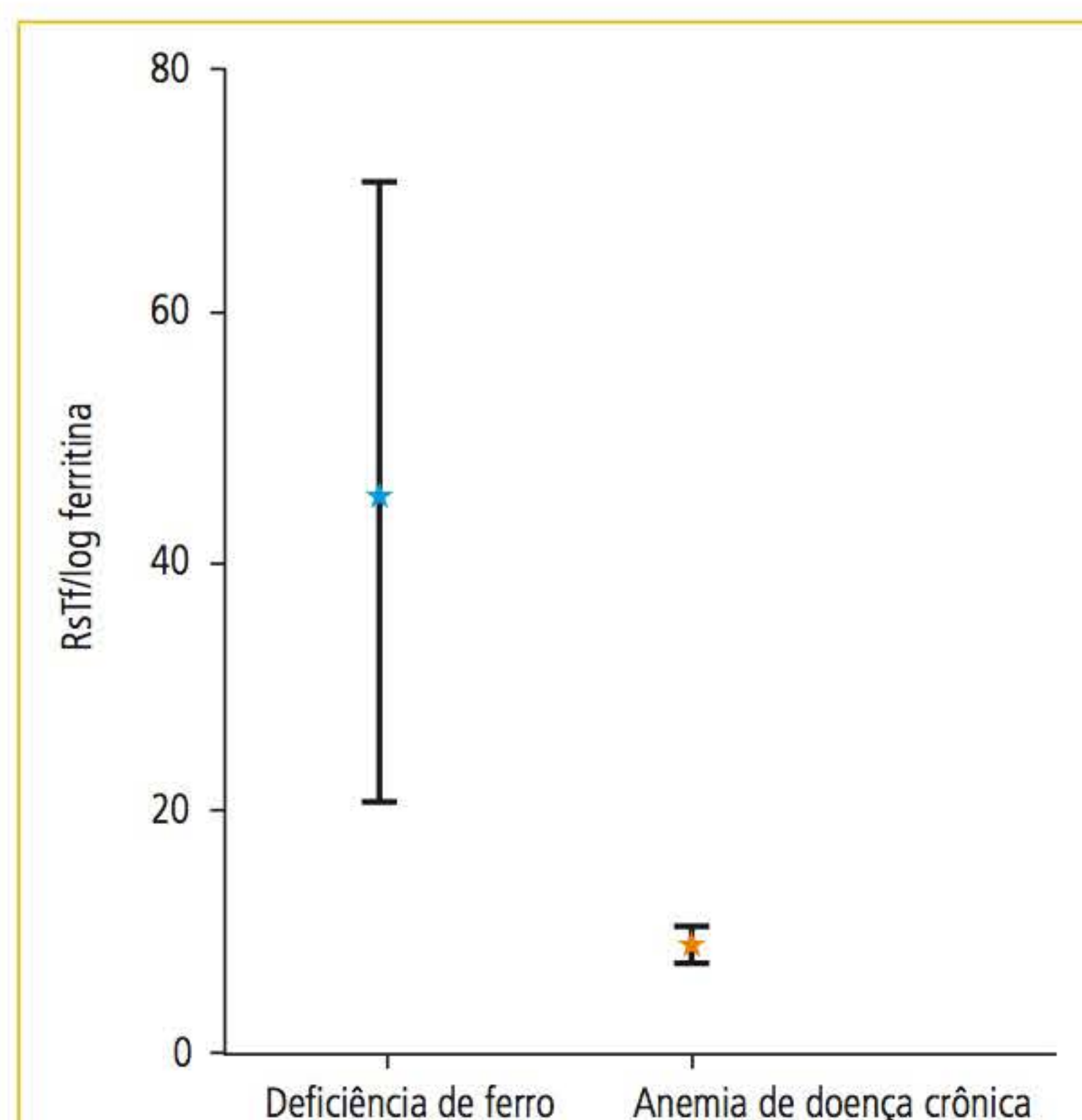
Valores abaixo de 12 µg/L de ferritina, na ausência de outras doenças, indicam a deficiência de ferro; porém, com a concomitante presença de doenças infecciosas e inflamatórias, esses níveis podem aumentar, o que diminui a sensibilidade do teste. A ferritina possui essa limitação por ser uma proteína de fase aguda (**Figura 7.2**).<sup>1</sup>

Dessa forma, a ferritina é um parâmetro que deve ser utilizado com rigoroso cuidado, principalmente em pacientes hospitalizados, nos quais a incidência das doenças multifatoriais é grande. No estudo de Burns e colaboradores,<sup>14</sup> os níveis de ferritina apresentaram pequena correlação com os estoques de ferro na medula óssea, determinados pela coloração de Perls, o que indica a possibilidade de resultados falso-positivos para a deficiência de ferro quando a ferritina é determinada de forma isolada. Neste mesmo estudo, demonstrou-se a alta eficiência (99,4%) e especificidade (87,6%) da associação entre a ferritina e a transferrina (determinada por imunoprecipitação) para o diagnóstico da deficiência de ferro.



### Receptor solúvel de transferrina (RsTf) e os índices RsTf/ferritina e RsTf/log ferritina

O receptor de transferrina (RsTf) é uma proteína transmembrana que facilita a entrada do ferro ligado à transferrina no interior das células. A forma solúvel da proteína pode ser detectada no plasma por métodos imunológicos e ser útil no diagnóstico da deficiência de ferro, bem como na sua distinção das anemias de doenças crônicas (**Figura 7.3**). Esse receptor é a principal via pela qual as células adquirem o ferro, especialmente os precursores eritroides na medula óssea,<sup>21</sup> sendo considerado um excelente teste para avaliar a atividade da medula óssea, com relação à eritropoiese. Com todas as limitações que os testes tradicionalmente utilizados para avaliar o metabolismo de ferro possuem, há uma grande busca por um método sensível e não invasivo para a detecção da deficiência de ferro. Vários autores sugerem que o receptor de transferrina é um parâmetro que clinicamente possui essas características.<sup>22-24</sup>



**FIGURA 7.3** Índice RsTf/log ferritina na deficiência de ferro e na anemia de doença crônica.

Fonte: Means.<sup>25</sup>

A distinção entre a anemia por deficiência de ferro e a anemia de doença crônica pode ser realizada por meio da interpretação dos valores do receptor de transferrina (RsTf), o que é muito difícil quando se usam apenas os testes laboratoriais convencionais. A maior vantagem do RsTf sobre a ferritina e a transferrina reside na importante ca-

racterística dos RsTf, que não são proteínas de fase aguda e, portanto, não são influenciados por processos infecciosos e inflamatórios.<sup>26</sup>

A diferença entre os níveis de RsTf na deficiência de ferro (elevados) e nas doenças crônicas (não elevados) necessita de maiores elucidações e estudos. Postula-se que os níveis de RsTf permanecem normais nas doenças crônicas por um mecanismo *dowregulation*, realizado pelas citocinas inflamatórias.<sup>21</sup>

Sob condições normais, os precursores eritroides se constituem no mais importante fator que influencia os níveis de RsTf. Baixos níveis de RsTf são observados em anemias aplásticas e na aplasia medular pura de células eritroides. Os RsTf também estão diminuídos em pacientes com hemocromatose de origem genética.<sup>21</sup>

Atualmente, as características laboratoriais de uma anemia por deficiência de ferro estão baseadas na presença de anemia, com hipocromia e microcitose, em conjunto com baixas concentrações de ferritina e aumento nos níveis dos receptores de transferrina.<sup>1</sup> Os receptores de transferrina presentes nos precursores eritroides e nos reticulócitos refletem a atividade eritropoiética que, na deficiência de ferro, apresenta aumento correspondente a uma regulação sobre a superfície celular, em resposta à maior demanda celular pelo ferro. Por este motivo, a concentração de RsTf reflete o real suplemento de ferro, às células e aos tecidos e, por não ser afetado por doenças infecciosas ou inflamatórias, é considerado o melhor indicador de uma deficiência de ferro quando coexistem processos inflamatórios.<sup>15</sup>

A transição do estado normal do metabolismo do ferro para a evolução de uma deficiência de ferro desenvolve-se de maneira sequencial, sendo que essas fases são difíceis de serem distinguidas por determinações laboratoriais convencionais. Acredita-se que a ferritina sérica e os RsTf têm sensibilidade para definir os estágios que ocorrem para o desenvolvimento de uma deficiência de ferro (**Figura 7.4**). Durante a fase I, os receptores de transferrina permanecem estáveis, enquanto se observa um decréscimo constante da ferritina. Quando o déficit de ferritina é suficiente para restringir a síntese de hemoglobina e outros componentes funcionais do ferro, a eritropoiese deficiente de ferro se instala (fase II). Nesta fase, o único indicador identificável é a elevação dos RsTf. Finalmente, a deficiência de ferro (fase III) desenvolve-se



	Normal	Estágio 1 Depleção dos estoques	Estágio 2	Estágio 3 Anemia ferropriva
Ferritina	22-203 µg/L	< 22 µg/L	< 22 µg/L	< 22 µg/L
Receptor de transferrina (RsTf)	1,15-2,75 mg/L	< 2,75 mg/L	> 2,75 mg/L	> 3,6 mg/L
Índice RsTf/log ferritina	0,63-1,8	> 1,8	> 2,2	> 2,8
Hgb Homem	12,8-16,8 g/dL	> 12,8 g/dL	> 12,8 g/dL	< 12,8 g/dL
Hgb Mulher	11,7-15,3 g/dL	> 11,7 g/dL	> 11,7 g/dL	< 11,7 g/dL

FIGURA 7.4 Perfil de ferritina e do RsTf nos estágios do desenvolvimento da deficiência de ferro.

Fonte: Suominen e colaboradores.<sup>27</sup>

com diminuição da concentração da hemoglobina, como resultado da progressiva depleção de ferro<sup>27</sup>. Portanto, a associação da ferritina com os RsTf pode fornecer informações importantes sobre as fases subclínicas da deficiência de ferro.

Suominen e colaboradores<sup>27</sup> definiram os estágios subclínicos da deficiência de ferro por meio das determinações de ferritina e RsTf. O estágio I (depleção de estoque) foi definido por concentrações de ferritina abaixo de 22 µg/L e concentrações normais de RsTf (abaixo de 2,75 mg/L). A fase seguinte (fase II), eritropoiese deficiente de ferro, foi definida por ferritina baixa (inferior a 22 µg/L) e por elevação dos níveis de RsTf (superior a 2,75 mg/L). A deficiência de ferro propriamente instalada foi considerada quando, juntamente a esses valores de ferritina e RsTf, a concentração de hemoglobina diminui abaixo dos limites preconizados (Figura 7.4).

Dessa forma, o RsTf vem sendo utilizado na prática clínica no diagnóstico diferencial entre anemia por deficiência de ferro e anemias de doenças crônicas, além de ser considerado útil para o reconhecimento das fases subclínicas da deficiência de ferro.

Adicionalmente, pelo motivo da ferritina avaliar os estoques e os RsTf avaliarem a funcionabilidade dos componentes do metabolismo do ferro, a combinação desses dois parâmetros é avaliada para um melhor *screening* do *status* do ferro. Desta forma, surgiram dois novos parâmetros, a razão entre o RsTf e a ferritina (RsTf/ferritina) e o índice RsTf/log ferritina.<sup>27</sup> A combinação entre o RsTf e a ferritina aumenta a sensibilidade para a

avaliação do metabolismo do ferro. Baixas concentrações de ferritina indicam depleção dos estoques de ferro e elevações dos RsTf indicam eritropoiese ferro-deficiente. Se a ferritina está elevada, a determinação de proteína C reativa deve ser dosada: se esta estiver elevada, a ferritina perde seu valor, por sofrer influência de citocinas inflamatórias. Entretanto, o uso do índice RsTf/log ferritina pode ser útil nessas situações. Se o índice for menor que 1 (< 1), a anemia de doença crônica está provavelmente envolvida, e a deficiência de ferro é descartada, enquanto que índices acima de 2 (> 2) podem indicar deficiência de ferro concomitante com uma anemia inflamatória crônica. Razões entre 1 e 2 são de causas indeterminadas, sendo sugestivo a coloração medular para confirmação do caso.<sup>21</sup> Além disso, o índice também demonstra ser útil para a discriminação dos estágios subclínicos da deficiência de ferro (Figura 7.4).

Conteúdo de hemoglobina do reticulócito (CHr) e os índices RsTf/ferritina e RsTf e RsTf/log ferritina

A quantidade de hemoglobina no interior do eritrócito e do reticulócito informam sobre a atividade da medula óssea, refletindo o equilíbrio entre o ferro e a eritropoiese. O conteúdo de hemoglobina no reticulócito (CHr) é um marcador mais precoce em relação ao conteúdo de hemoglobina no eritrócito devido ao pequeno tempo dos reticulócitos na circulação (1 a 2 dias). A taxa de hemoglobinização do eritrócito é atualmente analisada por meio desse parâmetro, obtido em contadores hematológicos que utilizam a dispersão de luz.



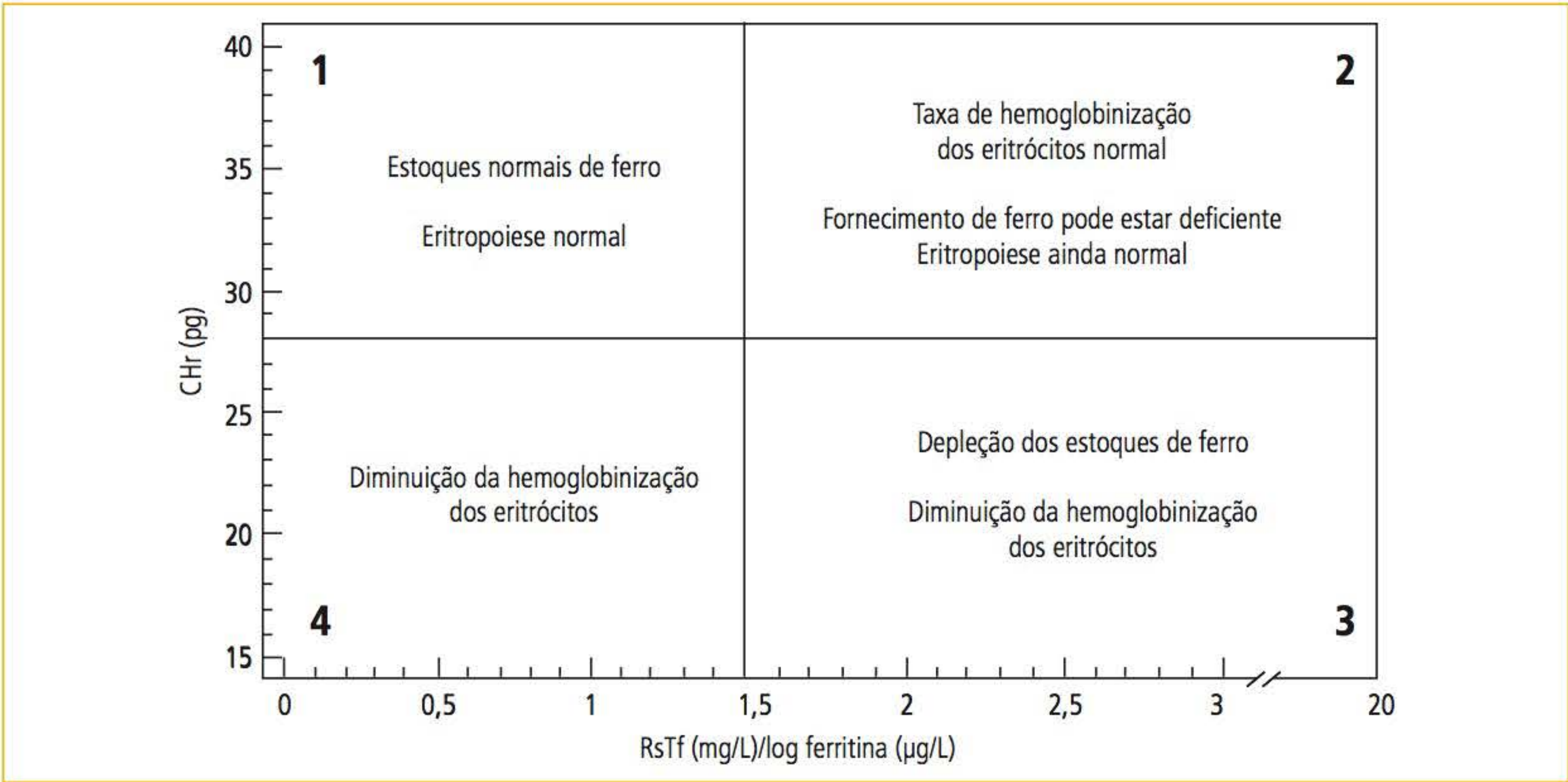
Thomas e Thomas<sup>1</sup> utilizaram em seu estudo valores de CHr acima de 28 pg e porcentagem de células HIPO acima de 10% como critérios ideais para avaliar uma hemoglobinização normal dos eritrócitos. Neste mesmo estudo, fases diferentes do metabolismo do ferro foram determinadas por meio do comportamento do CHr e do índice RsTf/log ferritina (**Figura 7.5**). Por meio de pesquisas e estudos sobre novos parâmetros que avaliem o metabolismo de ferro, novas perspectivas se abrem para um melhor entendimento, não só do estágio propriamente dito de deficiência de ferro, mas também de seus estágios de desenvolvimento.

**ANEMIA MICROCÍTICA E HIPOCRÔMICA NÃO HEMOLÍTICA: ANEMIA DE DOENÇA CRÔNICA**

Classifica-se a anemia de doença crônica como microcítica e hipocrômica quando a doença crônica de base é grave e cursa por longo tempo, porém, geralmente, a anemia nestes casos é normocítica e normocrômica. O termo anemia de

doença crônica foi utilizado pela primeira vez por Cartwright,<sup>28,29</sup> em 1966, e instala-se em pacientes que apresentam doenças infecciosas crônicas, inflamatórias ou neoplásicas.<sup>28</sup> Apresenta como característica laboratorial diminuição do ferro sérico com ferritina normal ou aumentada. A anemia de doença crônica é a anemia mais frequente em pacientes hospitalizados.<sup>28</sup> Em pacientes com artrite reumatoide, a frequência de anemia de doença crônica varia entre 27 a 58%, e esta aumenta quando a doença está em atividade clínica.<sup>30</sup> O **Quadro 7.1** mostra as condições patológicas que estão associadas à anemia de doença crônica.

A tríade que leva à instalação da anemia de doença crônica é a redução na vida média eritrocitária, resposta inadequada da medula óssea frente à anemia e distúrbio no metabolismo do ferro.<sup>31</sup> A diminuição da sobrevida eritrocitária pode ser consequência da ativação dos macrófagos (sistema mononuclear fagocitário) pelo processo inflamatório, infeccioso ou neoplásico. A sobrevida eritrocitária está estimada entre 80 a 90 dias para um



**FIGURA 7.5** Relação entre o CHr e o índice RsTf/log ferritina.

Fonte: Thomas e Thomas.<sup>1</sup>

QUADRO 7.1 Condições patológicas associadas à anemia de doença crônica		
INFECÇÕES CRÔNICAS FÚNGICAS, BACTERIANAS E VIRAIS	DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS	DOENÇAS NEOPLÁSICAS
Tuberculose, bronquiectasia, abscesso pulmonar, pneumonia, endocardite, miocardite, osteomielite, meningite, doença inflamatória pélvica, infecção pelo HIV e parvovírus B19	Artrite reumatoide, febre reumática, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn e sarcoidose	Linfoma, mieloma múltiplo e carcinoma



normal de 120 dias.<sup>28</sup> A resposta inadequada da medula óssea frente à anemia pode ser consequência da inibição da eritropoiese pelas citocinas inflamatórias produzidas pelos macrófagos ativados, entre elas a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). A ação supressora destas citocinas supera a ação da eritropoietina. O defeito básico no metabolismo do ferro é que ele não é disponibilizado para a síntese de hemoglobina, permanecendo como ferro de depósito. Isto ocorre porque citocinas produzidas pelos macrófagos ativados e neutrófilos promovem a retenção do ferro no sistema mononuclear fagocitário.<sup>30</sup>

Uma forma de não disponibilizar o ferro para a síntese de hemoglobina é o aumento que ocorre da lactoferrina, uma proteína semelhante à transferrina secretada pelos neutrófilos por ação da interleucina-1. A lactoferrina tem maior afinidade pelo ferro e não o transfere aos precursores eritrocitários. É endocitada pelo macrófago com a retenção do átomo de ferro. Os linfócitos T ativados liberam citocinas que ativam os macrófagos, os quais retêm o ferro no sistema mononuclear fagocitário.<sup>30</sup>

Requer cerca de 1 a 2 meses de doença básica instalada para que se manifestem os sintomas de anemia.<sup>31</sup> É uma anemia normocítica e normocrômica com concentração de hemoglobina entre 9 a 12 g/dL.<sup>30</sup> Entre 20 e 50% dos casos podem apresentar anemia microcítica, e 50% são casos de anemias hipocrômicas. A microcitose e a hipocromia, quando presentes, nunca são tão intensas quanto na anemia ferropriva, e a instalação da microcitose e hipocromia está na dependência da atividade da doença de base. Outra característica é que o RDW é normal, mostrando que a população eritrocitária é homogênea.<sup>31</sup>

Pode-se dizer que a anemia de doença crônica é uma síndrome de estresse hematológico induzido pela ativação de macrófagos e linfócitos em resposta a uma lesão celular causada por inflamação, infecção ou malignidade. Essa ativação pode levar a um aumento do sequestro de ferro e de ferro unido à proteína, aumento da sequestração esplênica dos eritrócitos e liberação de citocinas para a supressão da eritropoietina.<sup>31</sup>

### Características laboratoriais

Laboratorialmente, apresenta-se como uma anemia que varia de discreta a moderada; morfológicamente, classifica-se como normocítica e nor-

mocrômica, podendo tornar-se microcítica e hipocrômica dependendo da atividade clínica da doença de base. Pela classificação fisiológica, é não hemolítica com contagem normal de reticulócitos tanto em valor relativo quanto absoluto e IPR não hemolítico. A população eritrocitária é homogênea, RDW normal e as alterações morfológicas são discretas.

A deficiência de ferro desenvolve-se dentro de horas após a instalação do processo infeccioso ou inflamatório. A concentração de transferrina (CTLF) diminui de maneira mais lenta do que a concentração do ferro devido ao seu tempo de meia-vida que é maior (8 a 12 dias) do que o átomo de ferro (aproximadamente 90 minutos). A ferritina, por ser uma proteína de fase aguda, tem sua síntese aumentada provavelmente por citocinas inflamatórias, o que caracteriza o quadro inflamatório. A determinação dos receptores de transferrina é a maneira mais adequada para a diferenciação entre a anemia de doença crônica e a deficiência de ferro. Punnonen e colaboradores,<sup>5</sup> estudando o comportamento de vários parâmetros hematológicos e bioquímicos, concluíram que a correlação entre a ferritina e o receptor de transferrina (RsTf/log ferritina) permite clara diferenciação entre as duas condições.

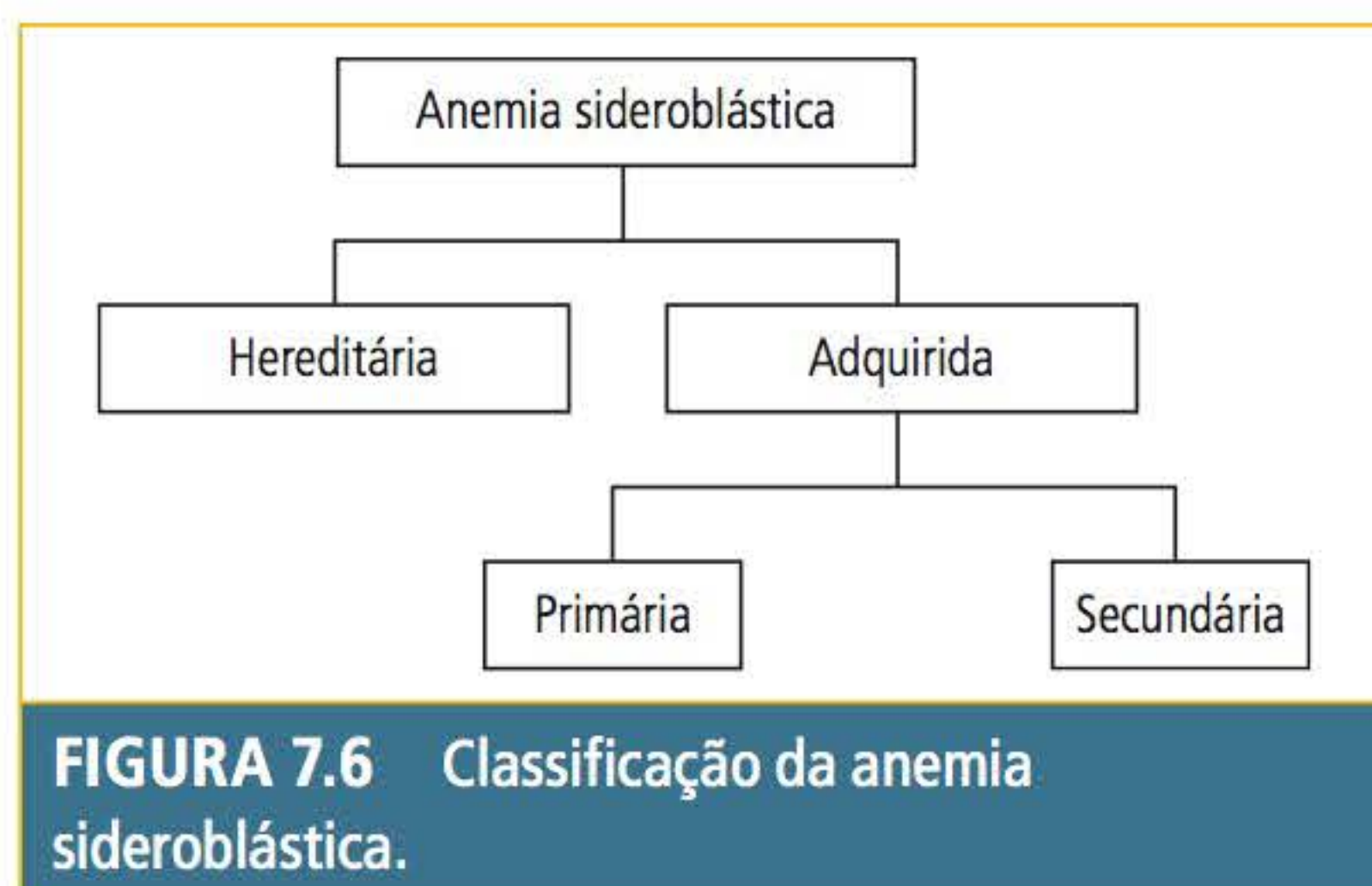
### ANEMIA MICROCÍTICA E HIPOCRÔMICA NÃO HEMOLÍTICA: ANEMIA SIDEROBLÁSTICA

É um grupo de doenças que tem como característica comum um defeito na utilização do átomo de ferro e na produção do grupamento heme,<sup>32</sup> fazendo com que o átomo de ferro seja depositado nas mitocôndrias dos eritroblastos em uma distribuição perinuclear, principalmente nos estágios finais de maturação dos eritroblastos, formando um anel em torno do núcleo. Esses eritroblastos recebem o nome de sideroblastos em anel.<sup>33</sup> Em aspirado de medula óssea, são facilmente reconhecidos após coloração com azul da Prússia.<sup>32</sup>

Ocorre uma produção insuficiente do grupamento heme por diminuição da protoporfirina ou pela incorporação inadequada do ferro à protoporfirina,<sup>33</sup> e como a síntese do heme está prejudicada, há uma consequente diminuição da produção de globinas. O acúmulo do ferro na mitocôndria dos eritroblastos ocorre porque a absorção do ferro continua e o transporte para a síntese da hemoglobina (mitocôndria do eritroblasto)



também.<sup>32</sup> A anemia sideroblástica é caracterizada por uma eritropoiese ineficaz<sup>32</sup> com hiperplasia eritroide acompanhada de contagem de reticulócitos normal ou discretamente aumentada.<sup>33</sup> Apresenta níveis elevados de ferro sérico e de depósito,<sup>32</sup> mas a incorporação do ferro no heme é reduzida.<sup>33</sup> O paciente pode apresentar hiperbilirrubinemia devido à destruição, por mecanismos apoptóticos, dos sideroblastos.<sup>34</sup> A população eritrocitária formada é microcítica e hipocrômica, mostrando que há uma dificuldade na formação da molécula da hemoglobina, o grau de microcitose e hipocromia é variável e existe um dimorfismo celular. Junto com a população microcítica e hipocrômica pode haver uma população normocítica e normocrômica ou macrocítica.<sup>33</sup> A anemia sideroblástica pode ser classificada em hereditária ou adquirida. A primeira pode ser dividida em ligada ao sexo, autossômicas ou mitocondriais,<sup>35</sup> e a segunda, de causa primária, que é considerada uma síndrome mielodisplásica, ou de causa secundária.<sup>35</sup> A de causa primária é irreversível, e a de causa secundária, reversível.<sup>32</sup> A **Figura 7.6** traz a classificação das anemias sideroblásticas.

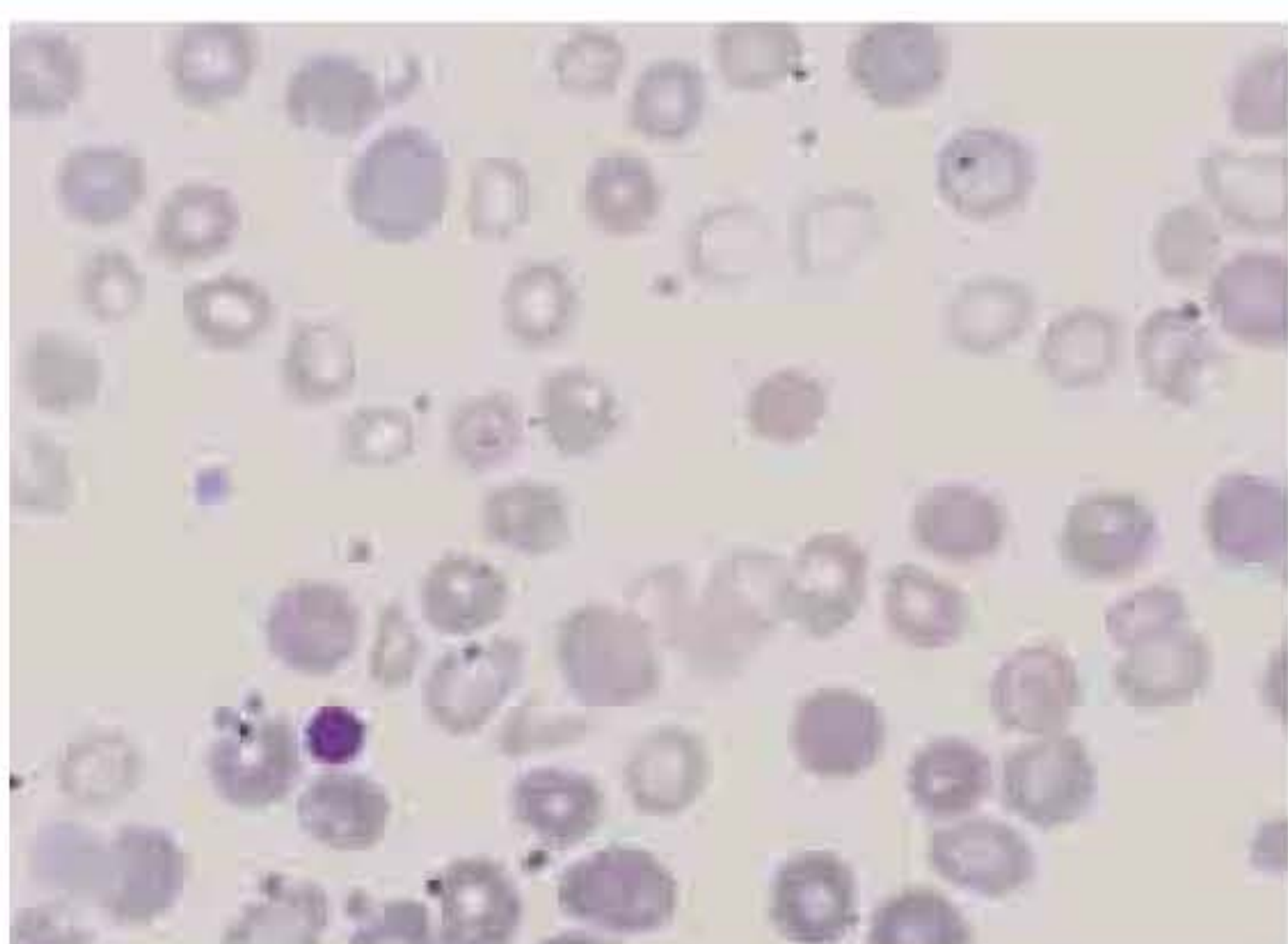


As formas hereditárias (ligada ao sexo e autossômica) da anemia sideroblástica são raras,<sup>35</sup> e a forma ligada ao cromossomo X (ligada ao sexo) afeta somente homens; a maioria dos pacientes tem uma atividade diminuída da enzima  $\delta$ -aminolevulinato sintetase.<sup>32</sup> Na maioria das vezes, a manifestação da anemia ocorre ao nascimento ou na infância, podendo ser muito grave (hemoglobina em torno de 6,0 g/dL), apresentando anisocitose intensa, microcitose (VCM entre 50 a 60 fL), hipocromia, pecilocitose com presença de codócitos, e o RDW é bastante elevado. A contagem de leucócitos e plaquetas é normal, mas pode estar diminuída quando o paciente apresenta esplenomegalia.<sup>33</sup> As mulheres portadoras da

forma ligada ao sexo apresentam um dimorfismo celular acentuado caracterizado por uma população microcítica e hipocrômica e outra normocítica e normocrômica<sup>36</sup>. O ferro sérico, a ferritina e a saturação da transferrina estão aumentados, o nível de protoporfirina eritrocitária livre (PEL) está normal ou diminuído.<sup>32</sup> A síndrome de Pearson é a forma mitocondrial da anemia sideroblástica hereditária que, além da anemia, caracteriza-se por secreção pancreática insuficiente e, eventualmente, falência renal e hepática.<sup>37</sup>

As anemias sideroblásticas idiopáticas adquiridas não reversíveis, também chamadas de anemia sideroblástica adquirida de causa primária ou de anemia sideroblástica refratária, são classificadas pela Organização Mundial da Saúde como uma síndrome mielodisplásica, e nesta classificação é chamada de anemia sideroblástica clonal (refratária). O termo refratário é utilizado porque a anemia não responde a nenhum tratamento;<sup>38</sup> pelo fato de apresentar sideroblastos em anel, descritos por Bjorkman em 1956,<sup>39</sup> é também chamada de anemia sideroblástica com sideroblastos em anel. São consequência de uma eritropoiese ineficaz que não é devida a nenhuma deficiência de compostos da via do heme. A anemia é consequência de um defeito da célula-tronco pluripotente, que tem uma meia-vida normal ou diminuída e apresenta alterações de maturação.<sup>32</sup> O ferro sérico e o ferro de depósito estão aumentados, mas a síntese de hemoglobina está diminuída, a apoptose está aumentada (apoptose patológica), e as células apresentam alterações cromossômicas<sup>40</sup> que envolvem os cromossomos 5, 11, 20 e Y (deleções) e trissomia do 8. Em torno de 10% dos pacientes, a anemia evolui para um quadro de leucemia mieloide aguda em um período que varia entre 10 a 15 anos. Não é comum em pessoas com idade inferior a 50 anos,<sup>41</sup> exceto em pacientes que foram tratados com rádio ou quimioterapia devido a um tumor maligno,<sup>35</sup> afetando ambos os sexos.<sup>32</sup> Em muitos casos, a doença é diagnosticada em exames de rotina e outras vezes pelos sintomas de anemia que o paciente apresenta.<sup>32</sup> A concentração da hemoglobina varia entre 7 a 10,0 g/dL, anemia de moderada a intensa, geralmente macrocítica, podendo ter uma população de células hipocrômicas, o que caracteriza o dimorfismo celular.<sup>35</sup> O RDW, muitas vezes, está discretamente aumentado. A **Figura 7.7** mostra uma extensão sanguínea com dupla população.





**FIGURA 7.7** Aspectos morfológicos de dupla população eritrocitária.

A extensão sanguínea apresenta anisocitose (aumento de RDW) e pecilocitose com presença de esquizócitos, codócitos e ponteados basófilos. Ocasionalmente, podem ser vistos eritroblastos.<sup>35</sup> A contagem de reticulócitos é normal. As contagens de plaquetas e leucócitos geralmente são normais, pode ocorrer diminuição da contagem leucocitária e, na linhagem das plaquetas, trombocitose ou trombocitopenia.<sup>35</sup>

As anemias sideroblásticas adquiridas reversíveis ou de causa secundária são causadas por uma série de agentes: isoniazida, pirazinamida, cicloserina, cloranfenicol, etanol, chumbo, entre outros.<sup>35</sup> Os mais comuns são a isoniazida, o álcool e elementos químicos como chumbo e cobre.<sup>32</sup> Nos alcoólatras crônicos, a anemia sideroblástica é causa isolada de anemia em 25 a 30%,<sup>35</sup> e, geralmente, outras causas estão associadas, como a deficiência de folato, que leva à anemia megaloblástica.<sup>32</sup> O álcool interfere na via metabólica da síntese do heme por inibir várias enzimas que participam desta via, afetando principalmente a atividade da  $\delta$ -aminolevulinato sintetase e a heme sintetase.<sup>32</sup> A anemia que se instala é de moderada a grave com a concentração de hemoglobina variando de 6 a 10,0 g/dL. A população eritrocitária também apresenta dimorfismo celular (microcítica e hipocrômica/normocítica e normocrômica) e o RDW está elevado. Os sideroblastos em anel são vistos na medula óssea. O ferro sérico e a ferritina estão elevados. Há aumento da bilirrubina e da desidrogenase láctica, como resultado da hemólise de eritroblastos na medula óssea, devido à eritropoiese ineficaz.<sup>32</sup> Nesse tipo de anemia, quando o agente causador é retirado, o quadro hematológico reverte-se dentro de algumas semanas.<sup>42</sup>

A isoniazida é um medicamento utilizado no tratamento da tuberculose que interfere no metabolismo da vitamina B<sub>6</sub>, na síntese do piridoxal fosfato e do ácido-5- $\delta$ -aminolevulínico, tendo como consequência uma deficiência na síntese do heme.<sup>12</sup> A anemia instala-se entre 1 a 10 meses após a instituição do tratamento,<sup>33</sup> variando de moderada a intensa com duas populações eritrocitárias, uma microcítica e hipocrômica e outra normocítica e normocrômica<sup>1</sup> com RDW elevado. Os sideroblastos estão presentes na medula óssea, e as concentrações de ferro e ferritina estão elevadas.

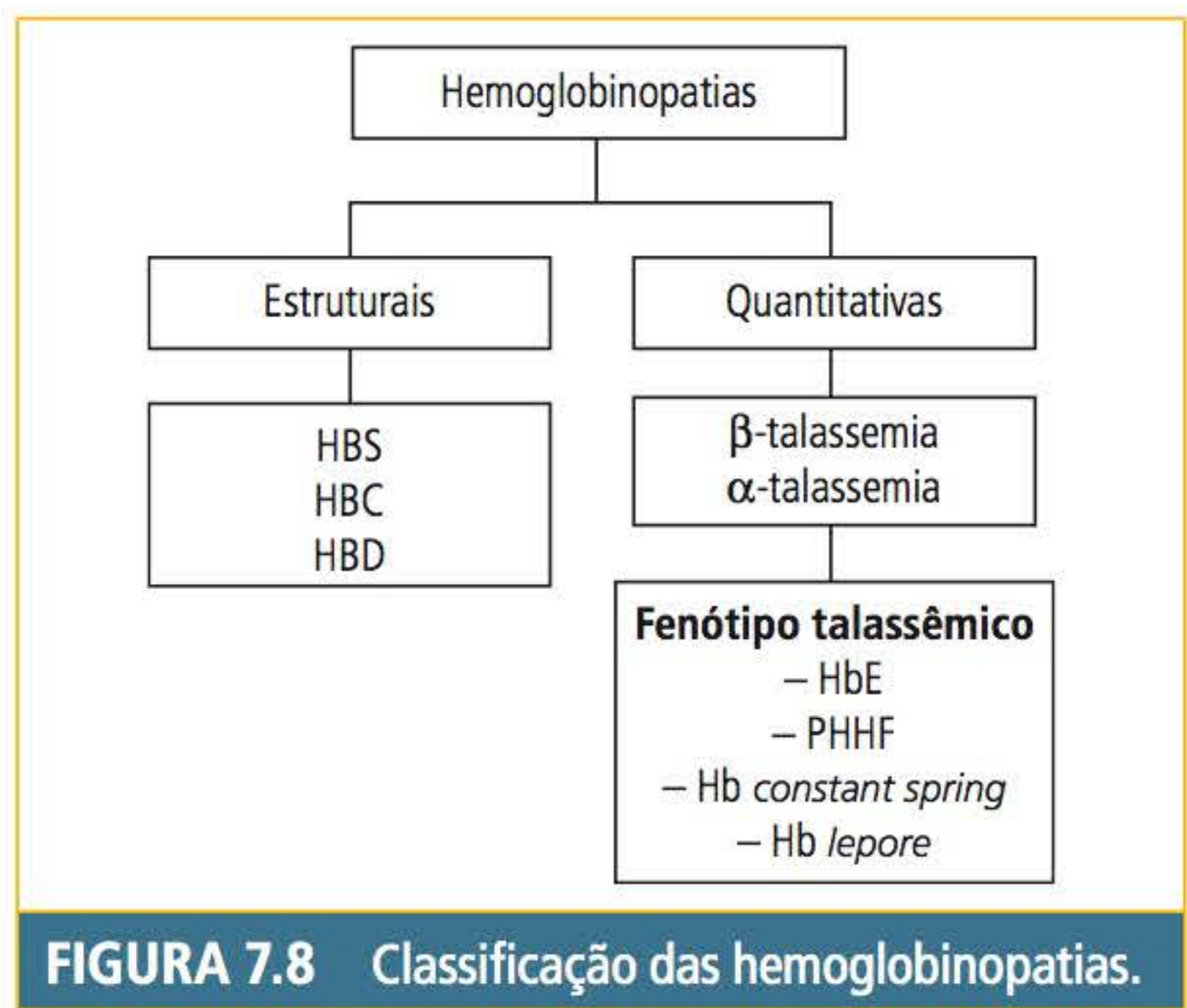
A intoxicação pelo chumbo ocorre em adultos por intoxicação ocupacional e em crianças por ingestão com materiais que contenham chumbo.<sup>33</sup> A maioria dos passos metabólicos da via do heme são inibidos pelo chumbo, o ácido delta-aminolevulínico (ALA) desidratase, a ferroquelatase, a coproporfirinogenoxidase e a porfobilinogênio deaminase são as mais sensíveis e na ordem citada.<sup>33</sup> Na intoxicação pelo chumbo, os tecidos hematopoiético, renal e nervoso central são afetados.<sup>32</sup> A anemia está presente em cerca de 25% dos afetados,<sup>43</sup> variando de leve a moderada com população eritrocitária microcítica e hipocrômica, e o achado hematológico característico são os ponteados basófilos proeminentes que podem estar presentes na ausência de anemia;<sup>32</sup> o RDW está elevado. A contagem de reticulócitos pode estar discretamente aumentada, os níveis de ferro sérico estão normais ou discretamente aumentados, e a ferritina está normal.<sup>32</sup>

## ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS HEMOLÍTICAS: TALASSEMIAS

As hemoglobinopatias podem ser classificadas em hereditárias e adquiridas. As hereditárias são classificadas em hemoglobinopatias causadas por defeitos genéticos que (1) acarretam alterações quantitativas na síntese das cadeias polipeptídicas (talassemias) ou (2) causam alterações estruturais (qualitativas) na sequência de aminoácidos das cadeias globínicas. As hemoglobinopatias qualitativas subdividem-se em hemoglobinopatias sem alterações fisiológicas, em hemoglobinas de agregação, hemoglobinas instáveis e adquiridas, que são as meta-hemoglobinemias.<sup>32</sup> A **Figura 7.8** ilustra esta classificação das hemoglobinopatias.

O defeito nas talassemias é a falta ou a produção insuficiente das cadeias de globina. Quando isto ocorre nas cadeias do tipo  $\alpha$ , tem-se as  $\alpha$ -talas-

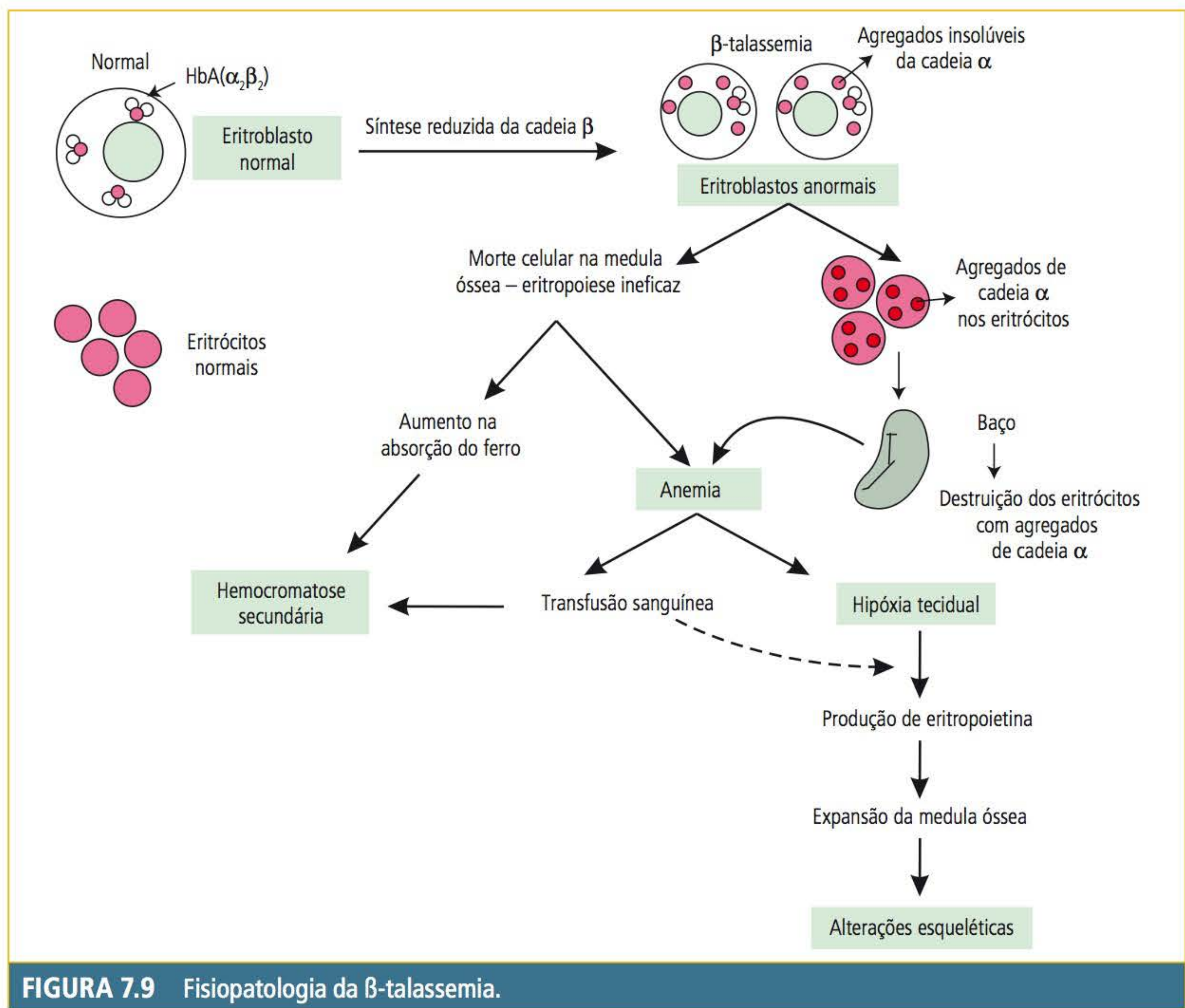




semias, e quando ocorre nas cadeias do tipo  $\beta$ , tem-se as  $\beta$ -talassemias.<sup>32</sup> A falta ou a insuficiência na produção devem-se a alterações cromossômicas como deleções, características da  $\alpha$ -talassemia, ou mutações (alterações gênicas), características das  $\beta$ -talassemias.<sup>32</sup> Estas alterações fazem com

que a produção das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  não seja mantida na proporção de 1:1. A talassemia é caracterizada por ser microcítica e hipocrômica com sinais ou características de hemólise, e a anemia está presente nas formas mais graves da doença que é proporcional ao déficit da cadeia. A **Figura 7.9** detalha a fisiopatologia da talassemia.

Como a síntese da cadeia globínica não afeta, permanece inalterada, há acúmulo e formação de agregados instáveis dessas cadeias, causando precipitação desses agregados, o que predispõe a destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea (eritropoiese ineficaz) e dos eritrócitos na circulação (hemólise).<sup>44</sup> A anemia instala-se quando a produção de eritrócitos é menor que a destruição, situação que ocorre nas formas mais graves da doença com a intensidade da anemia proporcional ao déficit de cadeia. A anemia acarreta uma baixa tensão de oxigênio nos tecidos. O tecido em hipóxia ordena que o rim produza eritropoietina (os níveis plasmáticos de eritropoieti-





na estão aumentados) e esta estimula os precursores eritrocitários a entrarem em mitose, com a finalidade de repor os eritrócitos destruídos. A medula óssea estimulada a produzir não consegue repor eritrócitos normais porque não tem uma produção eficiente de globinas, então, fecha-se um círculo vicioso em que os tecidos solicitam oxigenação, a medula está em franca atividade, mas o eritrócito, como produto final, não consegue carrear o oxigênio aos tecidos.<sup>32</sup> Este círculo vicioso tem como consequência uma expansão da medula óssea, que é proporcional à intensidade de hemólise, devido à sua grande atividade mitótica, o que pode levar à deformidade óssea conhecida como “fascies” talassêmica (característica da  $\beta$ -talassemia maior). A atividade e a expansão da medula óssea determinam o aumento da absorção do átomo de ferro. As repetidas transfusões que se fazem necessárias, nas formas mais graves das talassemias, levam ao aumento da concentração do ferro no organismo. Este aumento, caso o paciente não seja tratado com quelantes de ferro, tem como consequência deficiências endócrinas, cirrose hepática e falência cardíaca.<sup>31</sup>

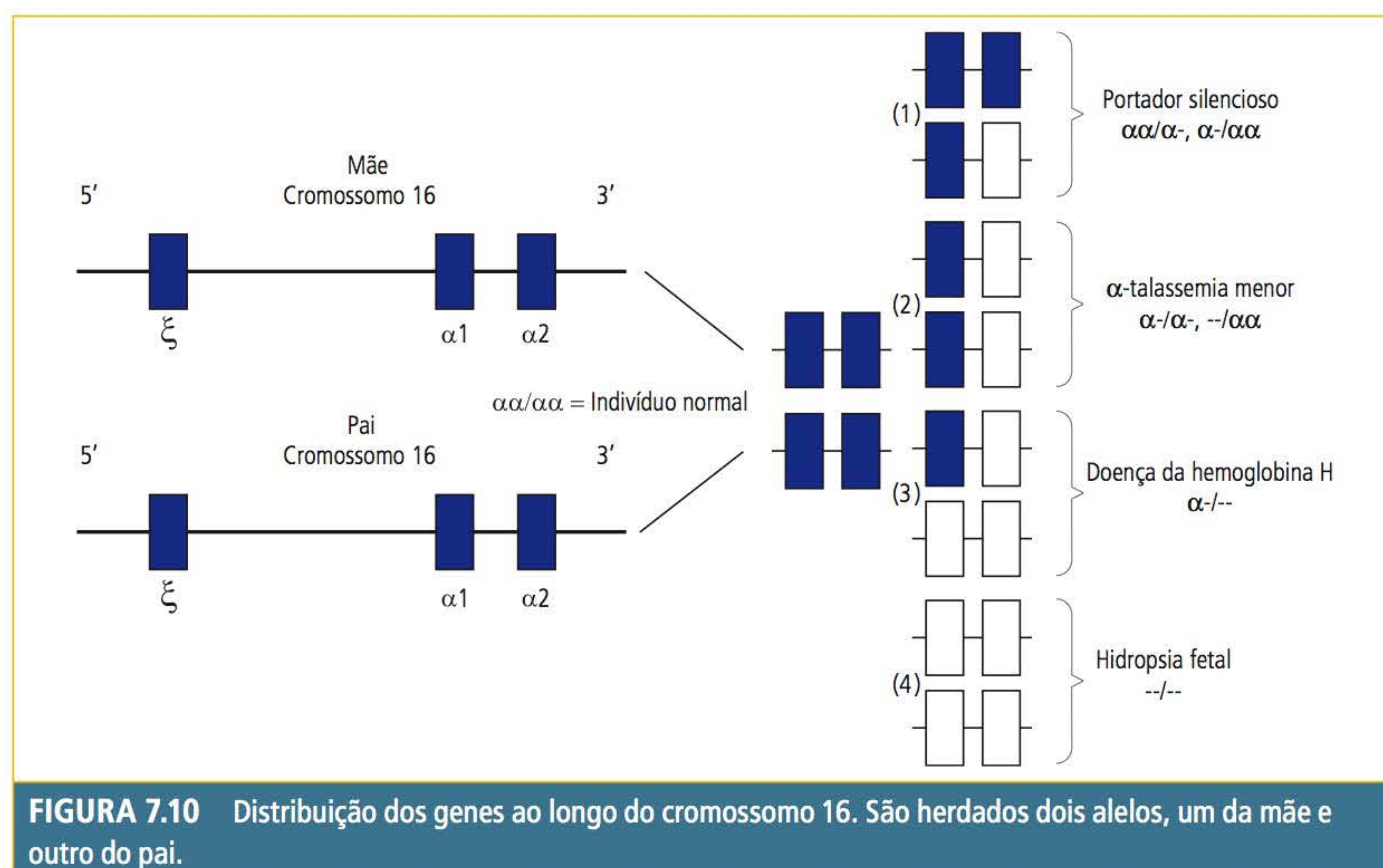
### $\alpha$ -talassemias

As  $\alpha$ -talassemias variam quanto à expressão da doença, desde formas extremamente graves, que são incompatíveis com a vida, até formas assinto-

máticas. As  $\alpha$ -talassemias podem ser classificadas em hidropsia fetal (deleção dos quatro genes da cadeia  $\alpha$ :  $-/-$ ), doença da hemoglobina H (deleção de três genes da cadeia  $\alpha$ :  $\alpha/-$ ),  $\alpha$ -talassemia menor (deleção de dois genes da cadeia  $\alpha$ :  $\alpha\alpha/-$ ,  $\alpha/-\alpha$ ,  $-/-\alpha\alpha$ ) e portador silencioso (deleção de um gene  $\alpha$ :  $\alpha\alpha/\alpha-$ ,  $\alpha/-\alpha\alpha$ ).<sup>31</sup> A **Figura 7.10** ilustra a distribuição dos genes ao longo do cromossomo 16.

Na hidropsia fetal, forma mais grave da doença, nenhuma cadeia  $\alpha$  é produzida. Na fase embrionária, é possível a produção das hemoglobinas Gower I e Portland. As hemoglobinas Gower II, Fetal,  $A_1$  e  $A_2$  não são formadas. O feto apresenta hemoglobina Bart's (4 cadeias gama:  $\gamma_4$ ) de 80 a 90%, hemoglobina H (4 cadeias beta:  $\beta_4$ ) e hemoglobina Portland (duas cadeias zeta e duas cadeias gama:  $\zeta_2\gamma_2$ ).<sup>32</sup> Este quadro clínico, conhecido como hidropsia fetal, acarreta a morte na fase fetal ou logo após o nascimento. O **Quadro 7.2** traz um resumo das características laboratoriais da hidropsia fetal, da doença da hemoglobina H, da  $\alpha$ -talassemia menor e do portador silencioso.

A doença da hemoglobina H caracteriza-se por ter um gene  $\alpha$  funcional e por ter alguma produção de cadeia  $\alpha$ . A hemoglobina Bart's está presente ao nascimento com concentração em torno de 20 a 40%; posteriormente, é substituída pela hemoglobina H, cuja concentração varia entre 5 a 40%. Como consequência, o paciente tem uma





**QUADRO 7.2** Características laboratoriais e clínicas da hidropsia fetal, da doença da hemoglobina H,  $\alpha$ -talassemia menor e portador silencioso

HIDROPSIA FETAL			
- -/- -	<ul style="list-style-type: none"> <li>VCM e HCM baixos</li> <li>Presença de eritroblastos</li> <li>Pecilocitose intensa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hemoglobina &lt; 7,0</li> <li>Hb Bart's = 80-100%</li> <li>Hb H = até 20%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anemia grave</li> <li>Esplenomegalia</li> <li>Hepatomegalia fatal</li> <li>Relação cadeias <math>\alpha:\beta = 0:1</math></li> </ul>
DOENÇA DA HEMOGLOBINA H			
$\alpha$ -/- -	<ul style="list-style-type: none"> <li>VCM e HCM baixos</li> <li>Pecilocitose intensa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hemoglobina &lt; 8,0 a 10</li> <li>Hb Bart's = Presença</li> <li>Hb H = 2 a 40%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anemia grave</li> <li>Esplenomegalia</li> <li>Hepatomegalia</li> <li>Expectativa diminuída</li> <li>Relação cadeias <math>\alpha:\beta = 0,4:1</math></li> </ul>
$\alpha$ -TALASSEMIA MENOR			
$\alpha\alpha$ - -	<ul style="list-style-type: none"> <li>Discreta microcitose</li> <li>Hipocromia</li> <li>Pecilocitose discreta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hemoglobina entre 10 e 13</li> <li>Hb H = 2 a 5%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normal</li> <li>Anemia discreta</li> <li>Relação cadeias <math>\alpha:\beta = 0,8:1</math></li> </ul>
PORTADOR SILENCIOSO			
$\alpha\alpha/\alpha-$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normal</li> <li>Relação cadeias <math>\alpha:\beta = 0,9:1</math></li> </ul>

anemia hemolítica crônica, a qual é também chamada de  $\alpha$ -talassemia intermediária. A hemoglobina Bart's forma-se porque na fase fetal, pela falta ou redução da produção de cadeia  $\alpha$ , a hemoglobina fetal não se forma ou forma-se em quantidades reduzidas, há um excesso de cadeias  $\gamma$ , as quais se tetramerizam, formando estruturas com quatro cadeias  $\gamma$ . O mesmo raciocínio é feito para a hemoglobina H, que se forma pelo excesso de cadeia  $\beta$  e tetrameriza-se em quatro cadeias  $\beta$ .<sup>31</sup>

Na  $\alpha$ -talassemia menor, o paciente apresenta dois genes  $\alpha$  funcionantes. Isto confere uma quantidade de cadeia  $\alpha$  que proporciona uma boa concentração de hemoglobina A a ponto de não apresentar anemia ou, quando presente, ser discreta, apresentando uma concentração reduzida de hemoglobina H, entre 2 a 5%. O quadro de  $\alpha$ -talassemia menor, pelo fato de apresentar microcitose (VCM geralmente abaixo de 70,0 fL), hipocromia (HCM abaixo de 22 picogramas) e CHCM (em torno de 31%), muitas vezes é confundido com anemia ferropriva. Esta situação ocorre quando não se dosa o ferro sérico e a ferritina

para a comprovação do diagnóstico. Na  $\alpha$ -talassemia menor, o ferro sérico e a ferritina estão normais ou aumentados.<sup>31</sup>

O portador silencioso apresenta três genes funcionantes para cadeia  $\alpha$ , o que proporciona uma quantidade de cadeias  $\alpha$  suficiente para que o paciente não apresente sintomas clínicos e nem hematológicos, podendo apresentar ao nascimento até 2% de hemoglobina Bart's.<sup>31</sup>

O diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia é feito pelo hemograma e pela eletroforese de hemoglobina com a pesquisa da hemoglobina H, que deve ser feita a partir de um hemolisado realizado com saponina, porque os hemolisados com clorofórmio desnaturam a hemoglobina H. As pesquisas de corpos de inclusão eritrocitários, realizadas com azul de cresil brilhante ou novo azul de metileno, dão resultado positivo para hemoglobina H.

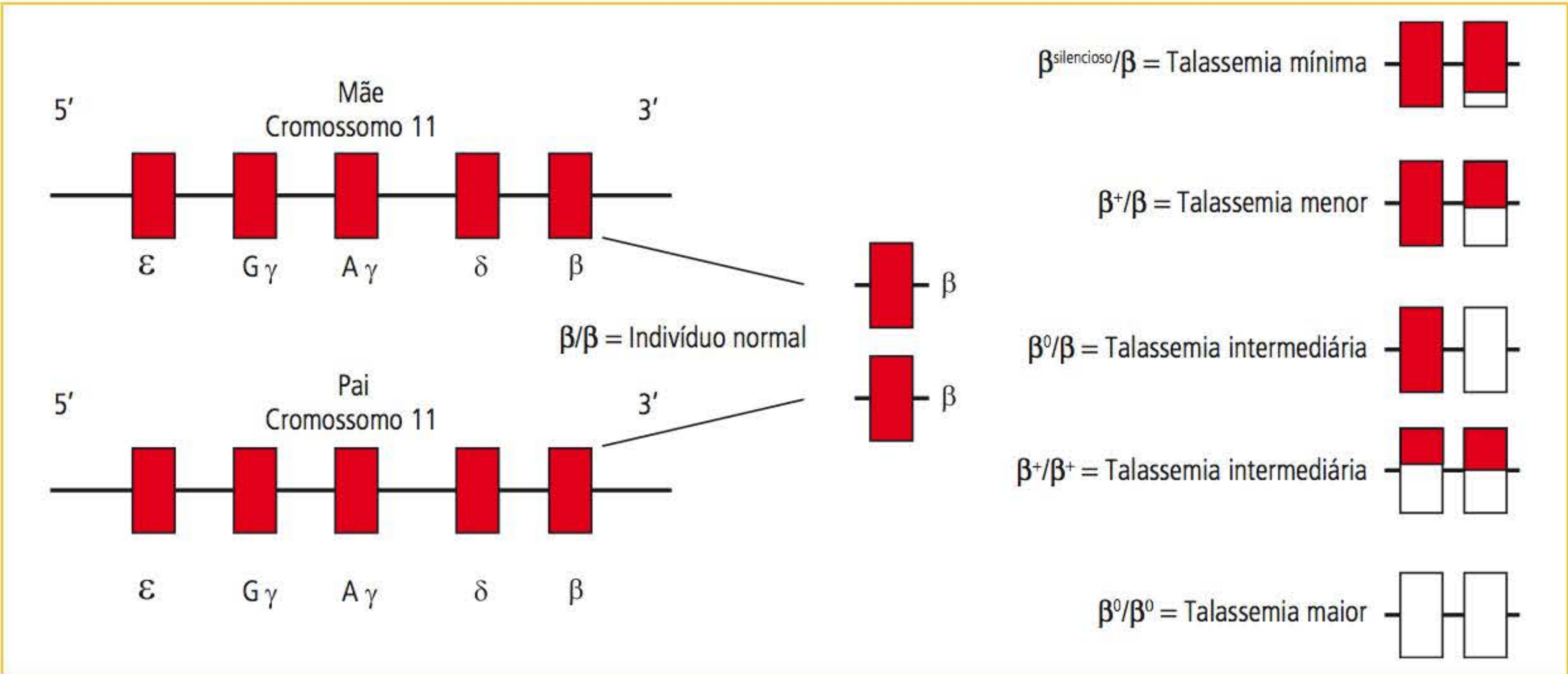
## $\beta$ -talassemia

As cadeias  $\beta$  são sintetizadas no cromossomo 11, e, além do gene  $\beta$ , estão presentes os genes épsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ ). Em indivíduos normais, são herdados um gene (alelo) da mãe e outro (alelo) do pai (**Figura 7.11**), e no tocante ao gene  $\beta$ , o genótipo normal é designado como  $\beta/\beta$ . A nomenclatura  $\beta^+$  é usada para ilustrar a produção diminuída do gene, enquanto a representação  $\beta^0$  indica a ausência total na produção do gene  $\beta$ . Nas  $\beta$ -talassemias, ainda pode ocorrer uma diminuição muito discreta na produção do gene, o que é conhecido como portador silencioso.

As  $\beta$ -talassemias podem ser classificadas em  $\beta$ -talassemia mínima, menor, intermediária e maior. A **Tabela 7.1** ilustra as características das  $\beta$ -talassemias.

- **$\beta$ -Talassemia maior:** A  $\beta$ -talassemia maior ( $\beta^0/\beta^0$  ou  $\beta^0/\beta^+$ ) é a forma mais grave de manifestação clínica, não produzindo cadeia  $\beta$ . O quadro clínico e hematológico manifesta-se como uma anemia hemolítica com intensa microcitose e hipocromia, atividade de medula óssea revelada por intensa policromatofilia e reticulocitose (que varia de 5 a 15%), acompanhada de icterícia (aumento de bilirrubina indireta), esplenomegalia (devido à intensa atividade fagocitária do baço) e alterações esqueléticas (expansão da medula óssea).<sup>32</sup> A concentração de hemoglobina está abaixo de 7,0 g/dL. É comum a presença de grande quantidade de eritro-





**FIGURA 7.11** Distribuição dos genes ao longo do cromossomo 11. São herdados dois alelos, um da mãe e outro do pai.

TABELA 7.1 Características das $\beta$ -talassemias						
	CLÍNICA	GENÓTIPO	HbA <sub>2</sub>	HbF	HbA	OUTRAS Hb
<b><math>\beta</math>-talassemia mínima</b>	Assintomática	$\beta^{\text{silencioso}}/\beta$	N	N	N	—
<b><math>\beta</math>-talassemia menor</b>	Discreta anemia Microcitose intensa	$\beta^+/\beta$	3-7	< 2	N	
		$\beta^0/\beta$	2-3	5-20	N	
		$\delta\beta^0/\beta$	< 2	1-3	N	Hb Lepore (5-15%)
		$\delta\beta^0\text{Lepore}/\beta$				
<b><math>\beta</math>-talassemia intermediária</b>	Anemia moderada a intensa	$\beta^+/\beta^+ *$	5-8	40-80	20-30	
		$\beta^0/\beta$	> 3,5	2-10	90-100	
		$\beta^+ / (\delta\beta)^0$	< 2	> 5	> 80	
		$\beta^0 / (\delta\beta)^0$	< 2	60-90	0	
		$\beta^+\text{ou } \beta^0 / (\delta\beta)^{\text{Lepore}}$	< 2	5-10	N	Hb Lepore (2-5%)
<b><math>\beta</math>-talassemia maior</b>	Anemia grave	$\beta^0/\beta^0$	1-6	> 94	0	
		$\beta^+/\beta^+ **$	3-9	20-90	P	
		$\beta^0/\beta^+$	0,6-3,4	> 75	P	
		$(\delta\beta)^{\text{Lepore}} / (\delta\beta)^{\text{Lepore}}$	0	75-92	0	Hb Lepore (8-30%)

\*, em negros; \*\*, em mediterrâneos.

blastos, codócitos e ponteados basófilos. Como o paciente não apresenta cadeia  $\beta$ , há um aumento de hemoglobina  $A_2$  e F. A concentração de hemoglobina F pode chegar a representar a totalidade da hemoglobina e a hemoglobina  $A_2$  pode chegar a 8% da hemoglobina total.<sup>31</sup> O diagnóstico laboratorial é feito pelo hemograma e pela eletroforese de hemoglobina com dosagem de hemoglobinas  $A_2$  e fetal.

■  **$\beta$ -Talassemia intermediária:** A  $\beta$ -talassemia intermediária apresenta uma concentração de hemoglobina em torno de 7 a 10,0 g/dL, com hipocromia e microcitose intensas, presença de codócitos, ponteados basófilos, eritroblastos e reticulócitos em torno de 3 a 10%, esplenomegalia e icterícia mais discretas e sem ou com poucas alterações esqueléticas. É uma anemia hemolítica com o mesmo quadro clínico e hematológico da



$\beta$ -talassemia maior, só que de intensidade mais leve. A concentração de hemoglobina  $A_2$  pode chegar até 10%, e a concentração da hemoglobina F varia entre 30 a 100%.<sup>31</sup>

- **$\beta$ -Talassemia menor:** A  $\beta$ -talassemia menor apresenta manifestações clínicas muito discretas, a concentração da hemoglobina está acima de 10 g/dL, as alterações hematológicas são discretas, com microcitose, hipocromia, codócitos, ponteados basófilos e reticulócitos em torno de 2 a 5%. Os níveis de hemoglobina  $A_2$  e F invertem-se: a hemoglobina  $A_2$  tem uma concentração em torno de 1,2 a 8%, enquanto a concentração da hemoglobina F fica em torno de 1 a 3%. A  $\beta$ -talassemia menor é um quadro hematológico que muitas vezes é confundido com anemia ferropriva pelo fato de apresentar microcitose e hipocromia sem sinais de hemólise evidentes, e o diagnóstico laboratorial diferencial deve ser feito pela dosagem da ferritina. A  $\beta$ -talassemia mínima ( $\beta$ silencioso) não apresenta alterações clínicas e hematológicas. A **Tabela 7.2** traz as alterações clínicas e hematológicas nas  $\beta$ -talassemias.

As **Figuras 7.12 e 7.13** demonstram as alterações hematológicas de casos de  $\beta$ -talassemia maior e menor, respectivamente.

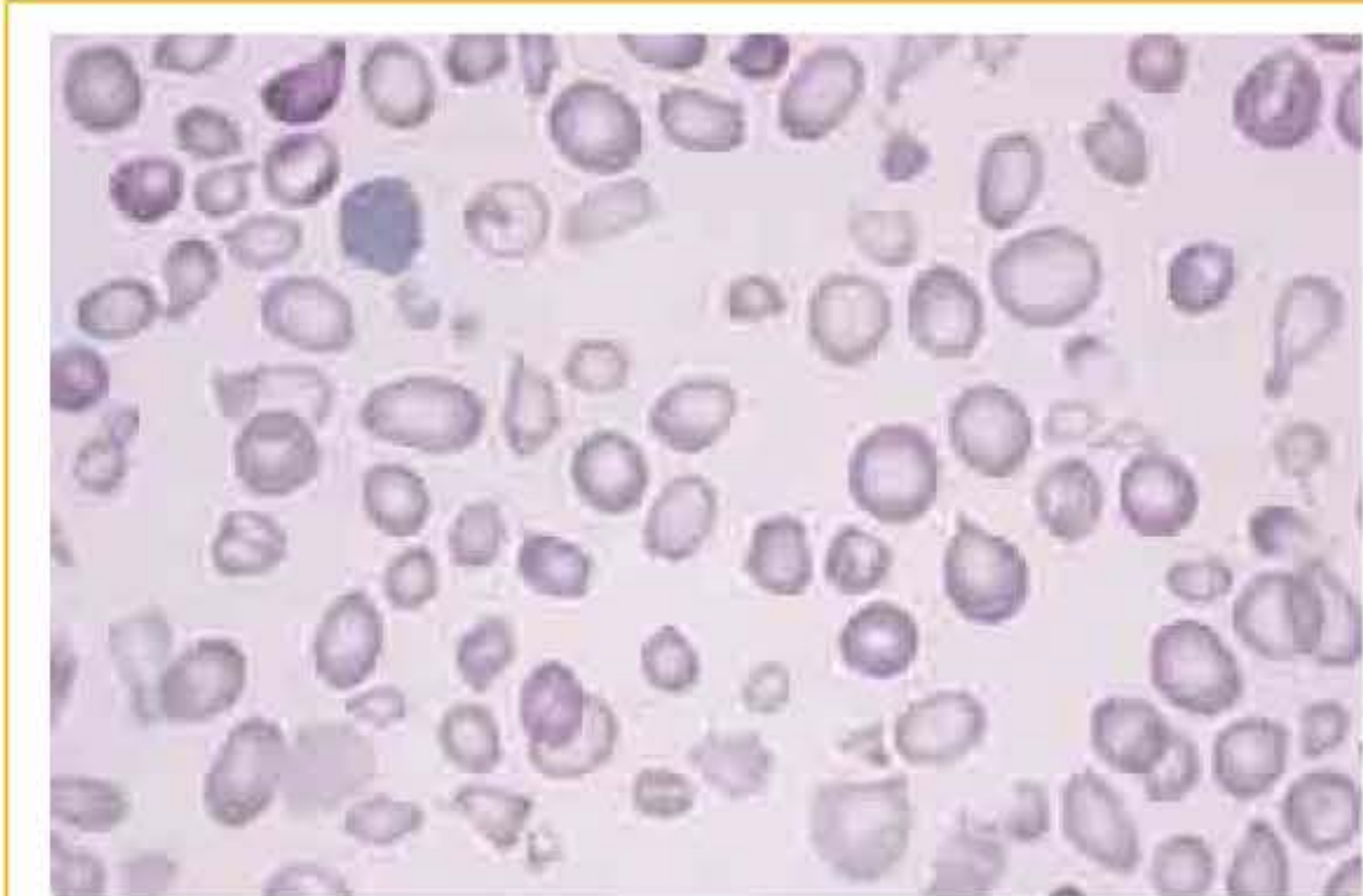


FIGURA 7.12 Quadro hematológico da  $\beta$ -talassemia maior.

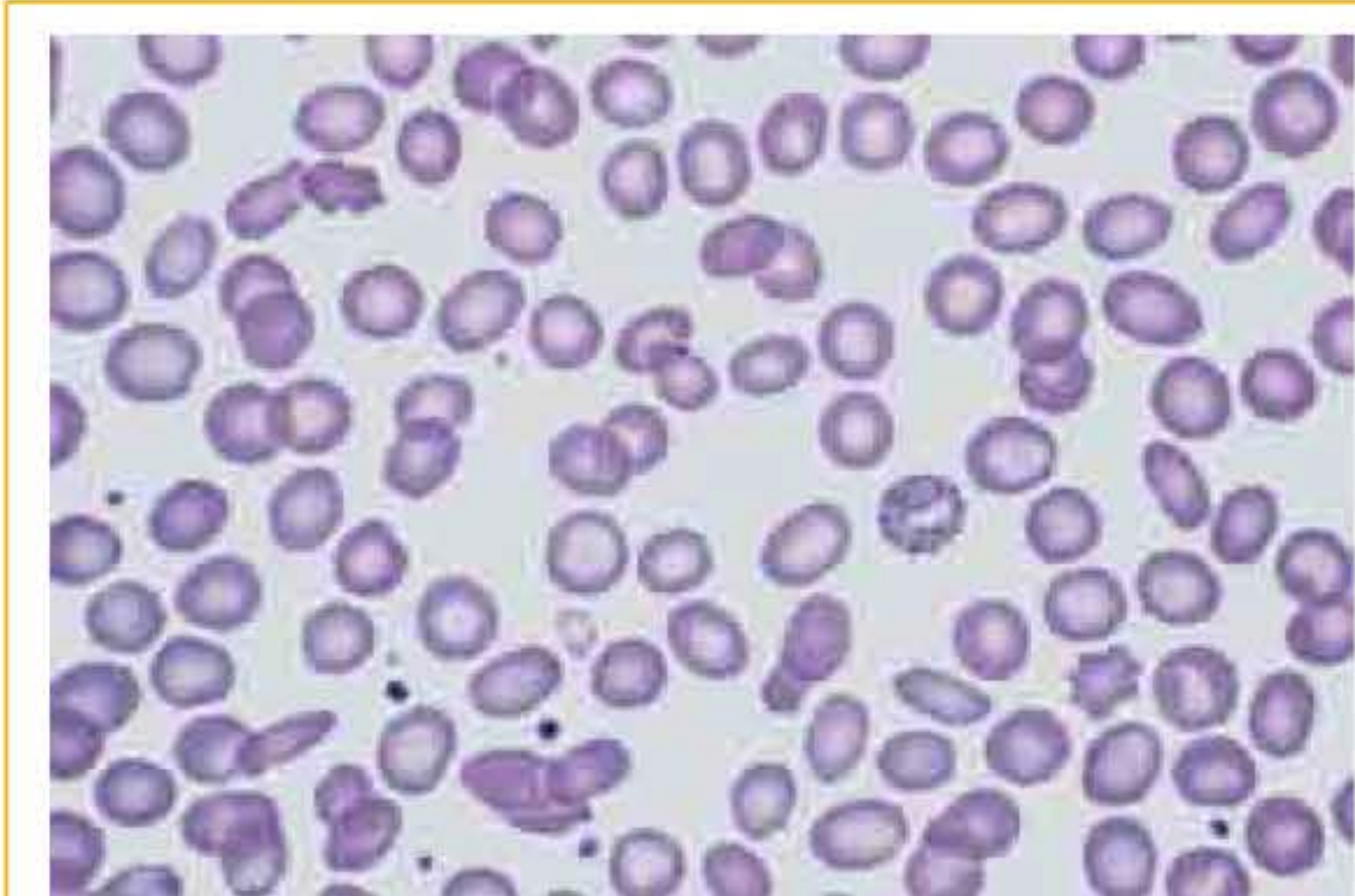


FIGURA 7.13 Quadro hematológico da  $\beta$ -talassemia menor.

TABELA 7.2 Alterações clínicas e hematológicas na $\beta$ -talassemia				
TALASSEMIAS				
	MAIOR	INTERMEDIÁRIA	MENOR	MÍNIMA
Intensidade	++++	++	+	0
Esplenomegalia	++++	+++ / ++	+ / 0	0
Icterícia	+++	++ / +	0	0
Alterações ósseas	++++ / +++	+ / 0	0	0
Hemoglobina	< 7	7-10	> 10	N
Hipocromia	+++	++	+	+
Microcitose	+++	++ / +++	++ / +++	0
Codócitos	+++	++	0 / +	+ / 0
Ponteados basófilos	++	+	+	+ / 0
Reticulócitos	5-15%	3-10%	2-5%	1-2%
Eritroblastos	+++	+ / 0	0	0
Hemoglobina A	Ausente	Presente	> 90%	97%
Hemoglobina $A_2$	Até 8%	Até 10%	2-8%	< 3,5%
Hemoglobina F	Até 100%	30-100%	1-3%	< 1,0%



### Deficiência de ferro, $\beta$ -talassemia menor e $\alpha$ -talassemia menor: diagnóstico diferencial

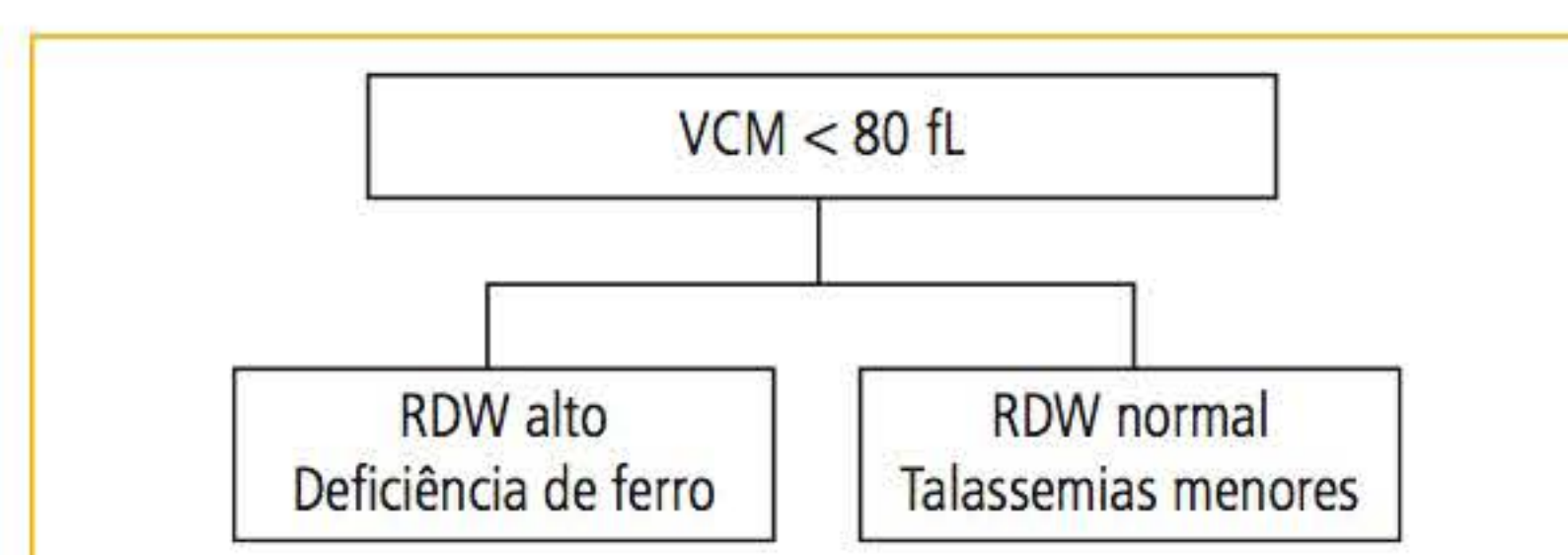
Sem dúvida alguma, entre as anemias que são comumente encontradas na rotina laboratorial, as microcíticas e hipocrômicas são as mais frequentes. Este quadro abre uma discussão importante sobre o diagnóstico diferencial entre as suas principais causas. O estado heterozigoto da  $\beta$ -talassemia menor apresenta perfil hematológico semelhante ao da  $\alpha$ -talassemia menor e é caracterizado por uma anemia microcítica que pode ser presumivelmente diagnosticada como anemia por deficiência de ferro, quando o diagnóstico se baseia apenas em dados hematimétricos e aspectos morfológicos, com a possibilidade de um tratamento desnecessário com ferro. Portanto, a diferenciação das anemias microcíticas é de grande importância clínica, particularmente em populações que possuem várias etnias.<sup>45</sup>

A anemia por deficiência de ferro é o resultado de um longo período de balanço negativo de ferro, e, durante este processo, os parâmetros hematimétricos são variáveis, iniciando com um eritrograma praticamente normal (às vezes, há elevação do RDW), passando para anemia discreta, morfológicamente normocítica e normocrômica até chegar ao estágio final microcítico e hipocrômico, quando a deficiência de ferro está totalmente instalada.

Alguns cuidados simples podem auxiliar no diagnóstico diferencial dessas condições. Eritrogramas de crianças, mulheres, gestantes e idosos que apresentam microcitose e hipocromia são sugestivos de deficiência de ferro. Microcitose acentuada em paciente masculino, adulto, sem história de sangramento, é indício de talassemia menor. Como as talassemias são doenças genéticas características de países banhados pelo Mar Mediterrâneo, a origem étnica do paciente também corrobora para o sucesso no diagnóstico das microcitoses.

A  $\beta$ -talassemia menor tem quadro característico e estável. São achados comuns uma elevada contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito discretamente diminuídos, com VCM e HCM muito reduzidos. A CHCM determinada por impedância é invariavelmente normal.<sup>6</sup> Na extensão sanguínea, a hipocromia, na maioria das vezes, é discreta, e o grau de pecilocitose é variável, podendo ser insignificante. Codócitos podem estar presentes. A presença de ponteados basófilos é achado frequente, o que reforça a possibilidade de  $\beta$ -talassemia menor.

Vários estudos têm explorado o uso do RDW como ferramenta para realizar o diagnóstico diferencial entre as talassemias menores e a deficiência de ferro. Desde a década de 1980, várias publicações enfatizam que a deficiência de ferro, pela heterogeneidade de sua instalação, possui como característica elevação do RDW. Por outro lado, as talassemias menores, pelo quadro hematológico estável, apresentariam RDW normal<sup>46</sup> (Figura 7.14).



**FIGURA 7.14** Diferenciação entre a deficiência de ferro e as talassemias menores pelo RDW.

Com o avanço das tecnologias dos analisadores, esse perfil pode ser controverso. Mello e colaboradores<sup>47</sup> por exemplo, citam a contagem de eritrócitos acima de 5 milhões/mm<sup>3</sup> como parâmetro mais sensível para o diagnóstico da  $\beta$ -talassemia menor. Lima e colaboradores<sup>48</sup> utilizando valor de RDW igual ou acima de 21%, identificaram corretamente 90% dos portadores de deficiência de ferro, enquanto valores abaixo desse (21%) foram eficientes no diagnóstico da  $\beta$ -talassemia em 77% dos casos. O que chama atenção é o valor de corte, bem maior que o limite de normalidade comumente utilizado na rotina laboratorial (14,5%).

Henneberg e colaboradores<sup>49</sup> estabeleceram o quadro hematológico característico de 75 indivíduos portadores da  $\beta$ -talassemia. Os  $\beta$ -talassêmicos apresentaram marcante microcitose (VCM abaixo de 71 fL) e hipocromia (HCM abaixo de 24 pg), com presença de ponteados basófilos, aliado à contagem de eritrócitos acima de 5 milhões/mm<sup>3</sup>. Com relação ao RDW, valores acima de 21% foram indicativos de deficiência de ferro, e valores abaixo desse foram observados nas duas condições.

Como o quadro da  $\beta$ -talassemia é estável e característico, fórmulas matemáticas que utilizam os parâmetros hematimétricos têm sido usadas para diferenciá-lo do quadro da deficiência de ferro. Entre essas fórmulas, destacam-se a fórmula de Green-King, de England-Fraser e a de Mentzer (Quadro 7.3).



QUADRO 7.3 Fórmulas matemáticas úteis na diferenciação entre a β-talassemia menor e a deficiência de ferro			
FÓRMULA			
Green-King	$\frac{VCM^2 \times RDW}{Hb \times 100}$	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Coulter® (impedância)</li><li>▪ Technicon® H1/H3 (laser)</li><li>▪ Sysmex® E-5000 (laser)</li></ul>	<b>Impedância elétrica</b> ≥ 65 = deficiência de ferro ≤ 65 = β-talassemia  <b>Dispersão Laser</b> ≥ 73 = deficiência de ferro ≤ 73 = β-talassemia menor
England-Fraser	$VCM - ERI - (5 \times Hb) - 3,4$	Coulter® (impedância)	≥ 0 = deficiência de ferro ≤ 0 = β-talassemia menor
Mentzer	$\frac{VCM}{ERI}$	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Coulter® (impedância)</li><li>▪ Technicon® H1 (laser)</li></ul>	<b>Impedância elétrica</b> ≥ 13 = deficiência de ferro ≤ 13 = β-talassemia  <b>Dispersão Laser</b> ≥ 14 = deficiência de ferro ≤ 14 = β-talassemia

Observe-se a aplicação prática do Índice de Green-King na **Tabela 7.3**. Nos dois eritrogramas microcíticos, no indivíduo 1, o valor encontrado para esse índice foi de 52,9, enquanto no indivíduo 2, o valor foi de 94,8. Utilizando tanto os limites de 65 (impedância) quanto o de 73 (dispersão a *laser*), o resultado do indivíduo 1 é indicativo de β-talassemia, enquanto o valor encontrado para o indivíduo 2 é indicativo de uma anemia por deficiência de ferro.

TABELA 7.3 Aplicação prática do Índice de Green-King		
ERITROGRAMA	INDIVÍDUO 1	INDIVÍDUO 2
RBC	6,11	4,42
HGB	12,5	8,8
HCT	39,0	28,8
VCM	63,7	65,1
HCM	20,4	19,9
CHCM	32,1	30,5
RDW	16,3	19,7

O achado de microcitose em indivíduo com reservas de ferro normal sem aumento na concentração A<sub>2</sub> ou hemoglobina fetal pode ser considerado uma evidência presuntiva de α-talassemia menor, particularmente se outros membros da família demonstram achados similares. As quantidades de HbH (apenas traços) não permitem a detecção por eletroforese de hemoglobina. A técnica para a detecção de hemoglobina H pelo azul

de cresil brilhante pode indicar a presença, porém a sensibilidade do teste não é totalmente confiável.<sup>50</sup> Para a completa elucidação laboratorial de uma α-talassemia menor, são necessários estudos genéticos, o que torna esse procedimento muito dispendioso e com poucos benefícios práticos. As **Figuras 7.15 e 7.16** demonstram o fluxo de testes para o diagnóstico da β e α-talassemia menores.

⚡ HEMOGLOBINOPATIAS VARIANTES

A maioria das hemoglobinas anormais difere da hemoglobina normal na substituição de um aminoácido por outro. São reconhecidas mais de 500 variantes de hemoglobina caracterizadas por uma substituição de aminoácido simples, a maioria envolvendo a cadeia β. Existem hemoglobinas anormais estruturalmente mais complexas. São descritas hemoglobinopatias caracterizadas por substituições de dois aminoácidos, por deleções, por fusão e por alongamento das cadeias globínicas.<sup>51</sup> Um exemplo de hemoglobinopatias por fusão de cadeias polipeptídicas é a hemoglobina Lepore.

A frequência das hemoglobinopatias varia consideravelmente de acordo com a localização geográfica e o grupo racial. As hemoglobinas S, C, D Punjab e E são denominadas como hemoglobinopatias comuns, por sua alta incidência. Cada hemoglobinopatia ocorre na forma heterozigota e homozigótica. No estado heterozigoto, os eritrócitos contêm tanto a hemoglobina normal (HbA) quanto a hemoglobina variante, sendo denominadas como portadoras do *traço* para aquela anormalidade. No estado homozigoto, a hemoglobina





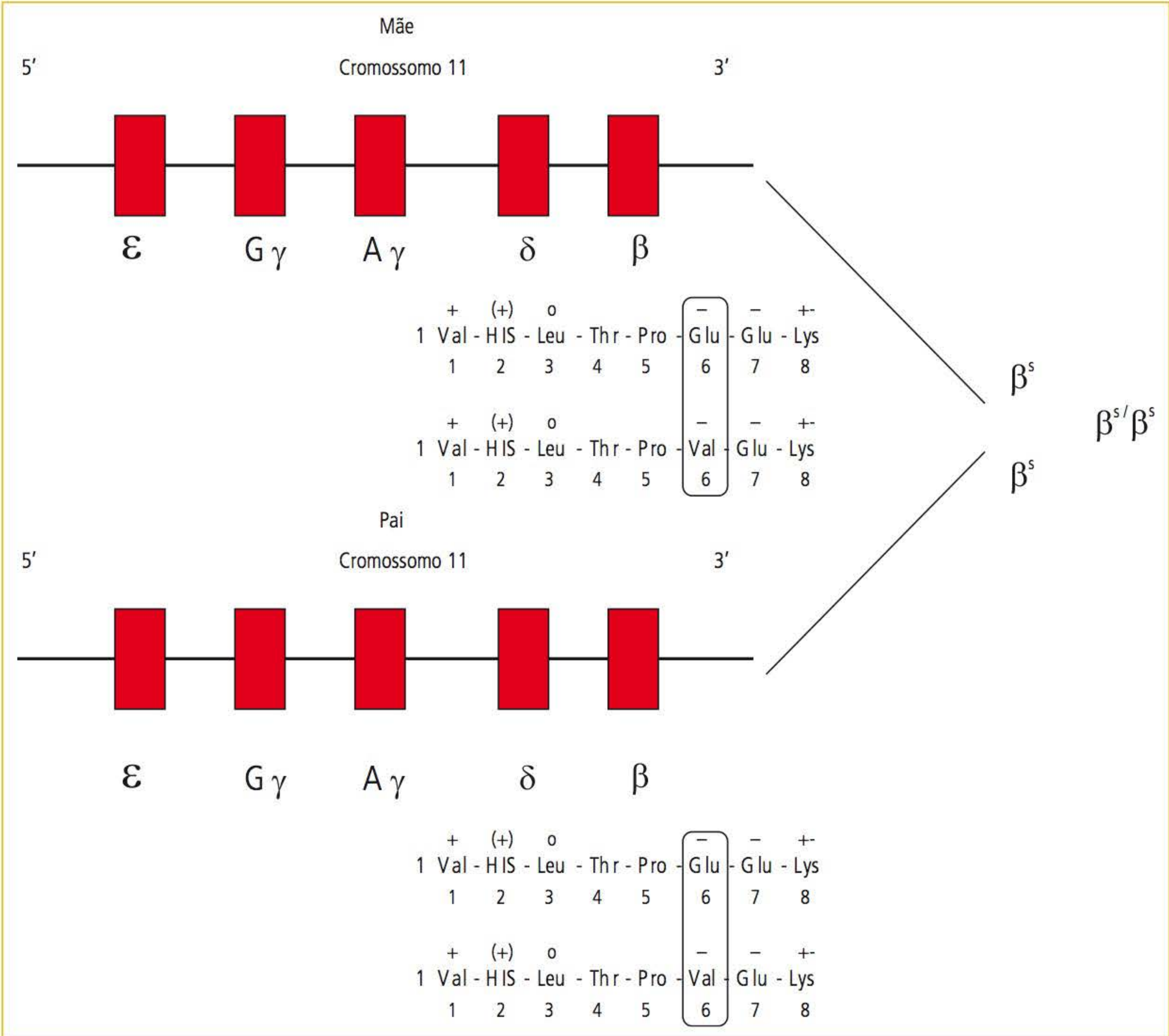


para a hemoglobina S (HbS; 6(A1)Glu→Val), na qual a hemoglobina variante resulta de uma mutação no gene β globínico (HBB: A→T).<sup>53</sup> A mutação falciforme substitui a timina pela adenina no sexto códon do gene β (GAC→GTG), codificando a valina em vez do ácido glutâmico na sexta posição do gene (**Figura 7.17**). Esta alteração é responsável por profundas mudanças na estabilidade e solubilidade moleculares da hemoglobina, como a tendência de polimerização quando a hemoglobina é desoxigenada.<sup>54</sup>

Uma das doenças hematológicas herdadas mais comuns em todo o mundo, a anemia falciforme é considerada a doença genética de maior incidência no Brasil. A doença, originária da África, surgiu há cerca de 100 mil anos, entre os períodos

paleolítico e mesolítico, tendo se estendido para a península Arábica e Índia e vindo para a América em decorrência do comércio de escravos negros trazidos do continente africano, distribuindo-se heterogeneamente pelo Brasil até a metade do século XIX. Com base em dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, estima-se que anualmente nasçam no Brasil 3.500 crianças com doença falciforme e cerca de 200 mil portadores do traço falciforme, fato que indica a abordagem dessa doença como problema de saúde pública.<sup>55</sup>

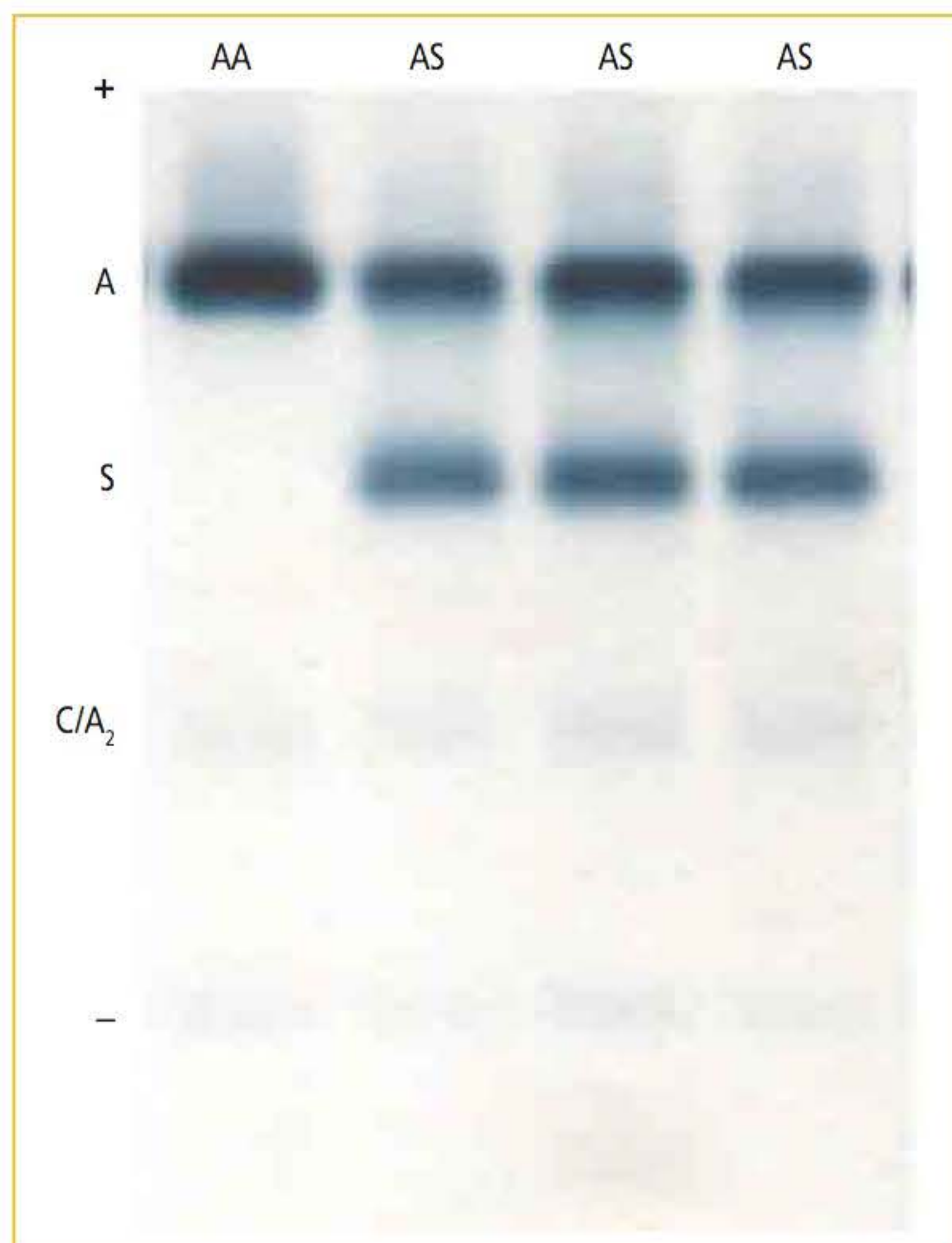
O ácido glutâmico é um aminoácido que tem sua cadeia lateral carregada negativamente com ponto isoelétrico (PI) de 2,77. A valina tem PI de 5,97 e, portanto, é classificada como um aminoácido sem carga, ou neutro. Essa troca de aminoáci-



**FIGURA 7.17** A troca do ácido glutâmico pela valina do códon 6 do gene β caracteriza a hemoglobina S. Quando é herdado um gene β<sup>s</sup> do pai e outro da mãe, o indivíduo tem o genótipo SS, ou seja, homozigoto para a anemia falciforme.



dos envolvendo a saída de um com carga negativa e a entrada de outro sem carga, resulta na perda de cargas negativas da hemoglobina S em relação à hemoglobina A, fato que causa a mobilidade eletroforética mais lenta da hemoglobina S (**Figura 7.18**).<sup>56</sup>



**FIGURA 7.18** Corrida eletroforética em gel de agarose em pH alcalino. A hemoglobina S migra em posição intermediária entre a hemoglobina A e as hemoglobinas C e A<sub>2</sub>.

A hemoglobina S no estado de baixa tensão de oxigênio sofre uma modificação na sua conformação molecular devido à presença do aminoácido valina, que interage com o receptor fenilalanina ( $\beta$ -85) e leucina ( $\beta$ -88) na molécula adjacente da hemoglobina S. Essa interação de natureza hidrofóbica desencadeia a formação de polímeros, compostos por fibras de desoxi-hemoglobina enoveladas entre si, em um processo chamado de nucleação, que progride com o alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimérica na forma de um eixo axial no interior da célula. A partir desse mecanismo, ocorre a transformação da clássica forma bicôncava do eritrócito em uma nova estrutura celular em forma de foice.<sup>32</sup>

No processo da falcização, há perda do controle da bomba de sódio e potássio, do controle de

cálcio e ATPase e há alteração da permeabilidade da membrana, e essas três situações fazem com que a falcização se torne irreversível.<sup>56</sup> O fato de o eritrócito estar submetido a repetidas mudanças de forma, de discoide para falcizada, acarreta mudanças na membrana que a tornam falcizada de modo irreversível.<sup>57</sup> O eritrócito falcizado acarreta o fenômeno de vaso-oclusão, que impede o fluxo sanguíneo para os tecidos e órgãos, desencadeando crises de dores ósseas, torácicas e abdominais intensas, afetando o crescimento, o sistema geniturinário, sistema cardiopulmonar, sistema nervoso, visão, causando anormalidades ósseas, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia hemolítica, e tornando o paciente propenso a infecções e à formação de úlceras de perna.<sup>31</sup> A vaso-oclusão caracteriza-se por ser um processo inflamatório no qual as células endoteliais estão ativadas, expressando moléculas de adesão que aumentam a aderência dos eritrócitos e leucócitos (neutrófilos e monócitos) à superfície endotelial. A célula endotelial ativada secreta fosfolipídeo (fator tecidual) e fator ativador de plaquetas (também produzido pelas próprias plaquetas, por neutrófilos e monócitos), que ativam a hemostasia primária e secundária, desencadeando a formação de trombos.

Os sinais clínicos da anemia falciforme manifestam-se entre 10 a 12 semanas após o nascimento. Antes desse tempo, devido à concentração elevada de hemoglobina fetal, o paciente não manifesta as consequências clínicas da anemia falciforme.<sup>57</sup> O paciente falciforme não tem na anemia o seu principal problema porque, pelo nível de hemoglobina, ele tem uma boa qualidade de vida. O que interfere na qualidade de vida do paciente são as crises que ele pode ter, como a crise de vaso-oclusão (crises de dor), crises aplásticas, crises de sequestração e crises hemolíticas. A crise de vaso-oclusão é uma característica da doença, sendo responsável pela dor localizada e pode ocorrer em qualquer órgão. São dores ósseas por infarto dos sinusoides da medula óssea, dores no peito e dor abdominal por infarto esplênico. A dor ocorre porque a isquemia a partir do ponto da vaso-oclusão leva à necrose tecidual. As crises aplásticas são causadas principalmente pelo parvovírus B19, que interrompe a proliferação da medula óssea com consequente queda da hemoglobina e reticulócitos. A falência de medula óssea também pode ser causada pela depleção dos estoques de folato. As



crises de sequestração são caracterizadas por uma hiperatividade do baço em que o sequestro da massa eritrocitária determina que a hemoglobina caia a uma concentração abaixo de 6,0 g/dL e responde por 10 a 15% das mortes na primeira década de vida. As crises de hemólise estão associadas com um aumento da bilirrubina indireta, da contagem de reticulócitos e queda da hemoglobina.<sup>57</sup>

### Haplótipos da anemia falciforme

Em 1978, Kan e Dozy publicaram a primeira descrição da existência de duas mutações distintas para a hemoglobina S, detectadas pela ação da enzima de restrição Hpa I no sítio de 5 kb a 3' do gene  $\beta$ , estabelecendo o conceito de origem multicêntrica para essa doença. Estudos subsequentes definiram os principais haplótipos para a anemia falciforme, utilizando enzimas específicas de restrição, o que permitiu uma melhor compreensão da heterogeneidade clínica da doença, além de terem importância para o seu estudo antropológico.<sup>58</sup>

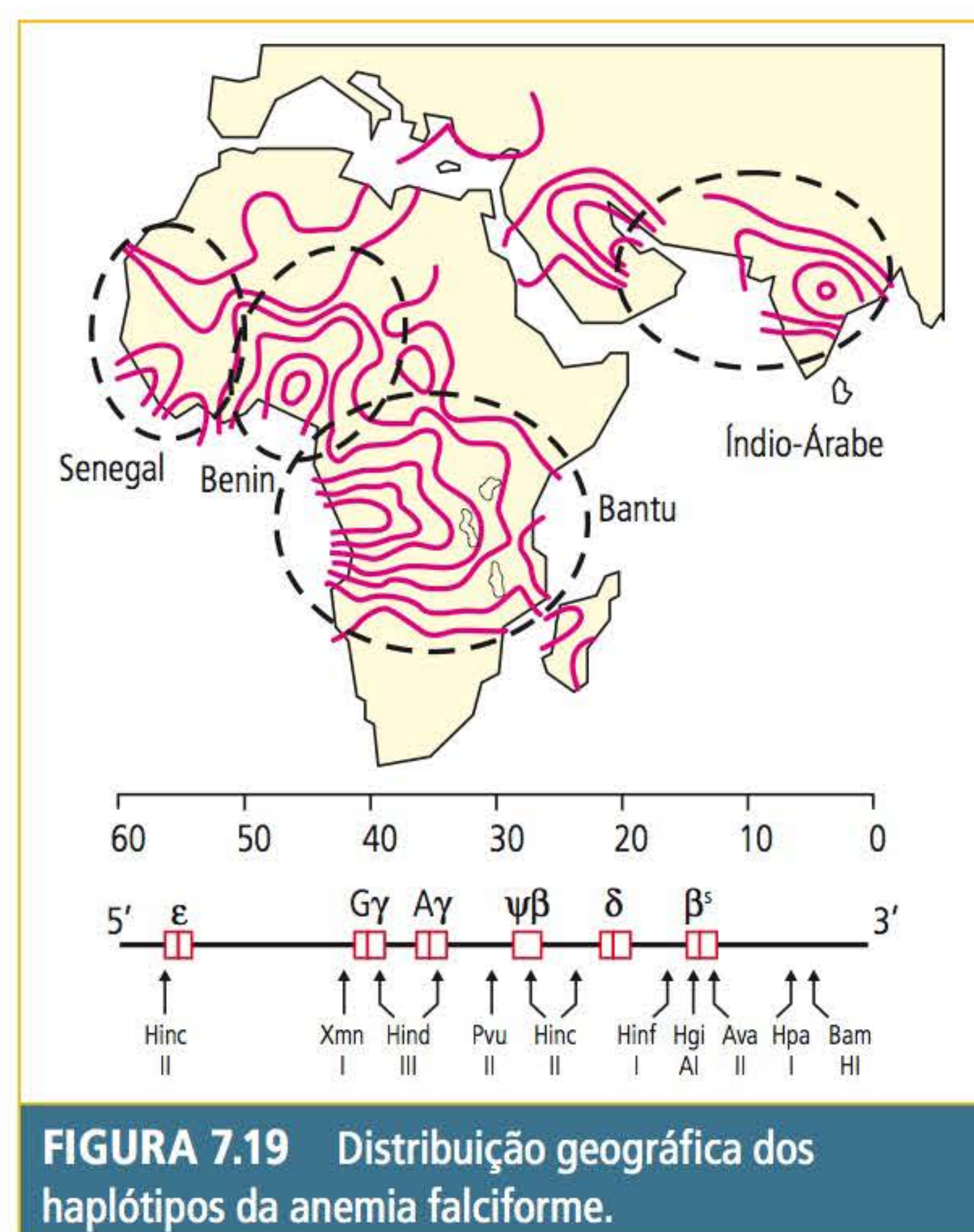
O gene  $\beta^s$  apresenta cinco tipos principais de haplótipos, nomeados de acordo com a área geográfica de sua maior prevalência.<sup>59</sup> Os grupos de haplótipos mais frequentes do *cluster* do gene  $\beta$  conhecidos são: Benin (BEN); República centro-africana ou bantu (CAR); Senegal (SEN); Camarões (CAM); Saudita ou Índio-árabe<sup>60</sup> (Figura 7.19). Os haplótipos do gene  $\beta^s$  possuem diferentes etnias e origens geográficas: o haplótipo Benin é

originado no meio-oeste africano; o Bantu ou CAR é típico tanto do centro sul quanto do leste africano; o Senegal tem origem na África atlântica; enquanto os haplótipos Camarões e o Árabe-saudita são encontrados na costa oeste da África, e na península arábica e Índia, respectivamente.<sup>61</sup> A identificação dos polimorfismos do gene  $\beta^s$  possibilita o estudo dos padrões culturais e migratórios dos povos africanos, afro-americanos e asiáticos. Nas Américas, o estudo dos haplótipos  $\beta^s$  tem contribuído para decifrar as intrincadas e complexas viagens que traziam os escravos negros da África para o novo continente entre os séculos XVI e XIX.<sup>59</sup> É bem conhecido que o fluxo genético da codificação da HbS para as Américas provém quase que exclusivamente da África, com exceção de uma pequena fração trazida por imigrantes europeus. Como o gene  $\beta^s$  se encontra distribuído ampla e heterogeneamente por todas as regiões americanas, a determinação das frequências dos seus polimorfismos tem levado historiadores e antropólogos a estudar as raízes ancestrais desse gene anormal.<sup>60</sup>

### Anemia falciforme e hemoglobina fetal

Os haplótipos do gene  $\beta^s$  têm papel importante na regulação variável da síntese da hemoglobina fetal, na relação final entre as concentrações de HbS e HbF no adulto e na taxa de redução da HbF durante a infância.<sup>62</sup> Estudos indicam que determinado tipo de haplótipo associado com níveis mais altos de hemoglobina fetal seriam acompanhados de doença menos grave. Por exemplo, a presença do haplótipo SEN, cujos portadores apresentam níveis maiores de HbF, estaria relacionada com a diminuição das crises dolorosas, de infartos ósseos e de insuficiência de órgãos, enquanto o haplótipo CAR, com níveis mais baixos de HbF, apresentaria manifestações clínicas mais graves.<sup>63</sup> Assim, o conhecimento do perfil genotípico da anemia falciforme, sua interação com outras hemoglobinopatias e os níveis de HbF são fundamentais para o entendimento da grande variabilidade das manifestações clínicas da doença.

A hemoglobina fetal é o tipo predominante de hemoglobina no período embrionário, permanecendo em grandes concentrações até o nascimento. Tanto a hemoglobina fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) quanto a hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ ) contêm cadeias  $\alpha$  e, portanto, a alteração na produção dessas hemoglobinas se dá pela troca na expressão do gene  $\gamma$  pelo gene  $\beta$ .



**FIGURA 7.19** Distribuição geográfica dos haplótipos da anemia falciforme.



Após seis meses do nascimento, a hemoglobina A torna-se a hemoglobina mais abundante, sendo que mutações que afetem a expressão do gene  $\beta$  tornam-se clinicamente evidentes.<sup>64</sup> A hemoglobina fetal é atualmente considerada o mais potente modificador da anemia falciforme e tem sido o modulador genético mais estudado na doença. Enquanto a persistência de produção de níveis altos de hemoglobina fetal não tem consequências clínicas em indivíduos saudáveis, essa característica pode conferir grandes benefícios clínicos a pacientes com doença falciforme e  $\beta$ -talassemias. A identificação dos mecanismos de modulação da hemoglobina fetal envolve não somente a identificação das variantes causais e dos genes cuja expressão elas alteram, mas também as consequências funcionais subsequentes.<sup>65</sup>

A evidência bioquímica de que a hemoglobina fetal é um potente inibidor da polimerização da desoxi-hemoglobina S é bem conhecida e confirmada em diversos estudos, havendo uma relação inversa entre a concentração de hemoglobina fetal e as crises características da doença falciforme.<sup>66</sup>

Dentro desse contexto, os haplótipos da anemia falciforme parecem estar intimamente ligados com a maior ou menor expressão da hemoglobina fetal. Uma das hipóteses estudadas é a relação dos haplótipos com a expressão das cadeias  $G\gamma$  e  $A\gamma$ , o que influencia diretamente a quantidade de hemoglobina fetal a ser produzida. Em recém-nascidos, a quantidade de cadeias  $G\gamma$  é maior que as cadeias  $A\gamma$ , em uma razão aproximada de 6:4; porém, no período adulto, essa relação inverte-se para 4:6, o que torna a quantidade de hemoglobina fetal muito pequena nesta fase em indivíduos normais. Porém, em alguns haplótipos da anemia falciforme, mantém-se a relação de cadeias  $G\gamma$  e  $A\gamma$  próxima ao período neonatal, mantendo-se, dessa forma, concentrações maiores de hemoglobina fetal, mesmo no período adulto.<sup>60</sup>

Demonstrou-se que a mutação C→T na posição -158 na extremidade 5' do gene  $G\gamma$  pode estar associada com um aumento da relação  $G\gamma:A\gamma$ . Essa mutação pode ser detectada por uma enzima de restrição específica (XmnI) e seria um dos marcadores para o polimorfismo encontrado em pacientes homozigotos para a hemoglobina S, oriundos da península arábica e de algumas tribos da Índia. Nestes pacientes, nos quais a concentração de hemoglobina fetal é maior, a doença desenvolve-se com menor gravidade clínica.<sup>67</sup>

Os haplótipos SEN e árabe-indiano estão associados com altas concentrações de hemoglobina fetal, com conservação da razão  $G\gamma:A\gamma$  do período neonatal, podendo chegar a 20% o nível de HbF nesses polimorfismos. Nesses haplótipos, as mutações observadas são muito semelhantes, diferenciando-se em poucos sítios de restrição com presença comum da mutação C → T na região promotora do gene  $G\gamma$ . O haplótipo CAR, ao contrário, apresenta relação  $G\gamma:A\gamma$  muito baixa, com níveis médios de HbF abaixo de 5%. Outros polimorfismos, como o BEN e CAM, apresentam concentrações intermediárias de HbF (5 a 15%), com uma razão  $G\gamma:A\gamma$  de 1:1.<sup>60</sup>

Diagnóstico da anemia falciforme

O diagnóstico da anemia falciforme baseia-se na separação eletroforética da hemoglobina S. O perfil eletroforético apresenta predomínio de hemoglobina S com concentrações variadas de hemoglobina fetal e concentração normal de  $A_2$ . Na eletroforese em pH alcalino, utilizando fitas de acetato de celulose, algumas hemoglobinas variantes raras podem migrar na mesma posição da hemoglobina S. No **Quadro 7.4**, estão descritas as hemoglobinas variantes que possuem mesmo perfil eletroforético que a HbS em eletroforese alcalina. Apesar dessa característica, essas hemoglobinas não polimerizam em condições de desoxigenação, o que traz características clínicas e hematológicas benignas quando comparadas com a anemia falciforme.<sup>51</sup>

QUADRO 7.4 Principais hemoglobinas variantes que migram na posição da HbS em acetato de celulose em pH 8,0 a 9,0
Hemoglobina D – Punjab
Hemoglobina D – Irã
Hemoglobina G Coughatta
Hemoglobina G Filadélfia
Korle Bu
Lepore
Zurique

O uso do teste de falcização e do teste de solubilidade para a HbS são úteis na distinção entre a HbS e a HbD pela positividade exclusiva para a presença de HbS. Das hemoglobinas variantes raras que também são insolúveis, destacam-se a HbC-Georgetown, a HbI e a Hb Bart. Vale desta-



car que tanto o teste de falcização quanto o teste de solubilidade não podem ser utilizados como forma definitiva de diagnóstico.

### Características laboratoriais

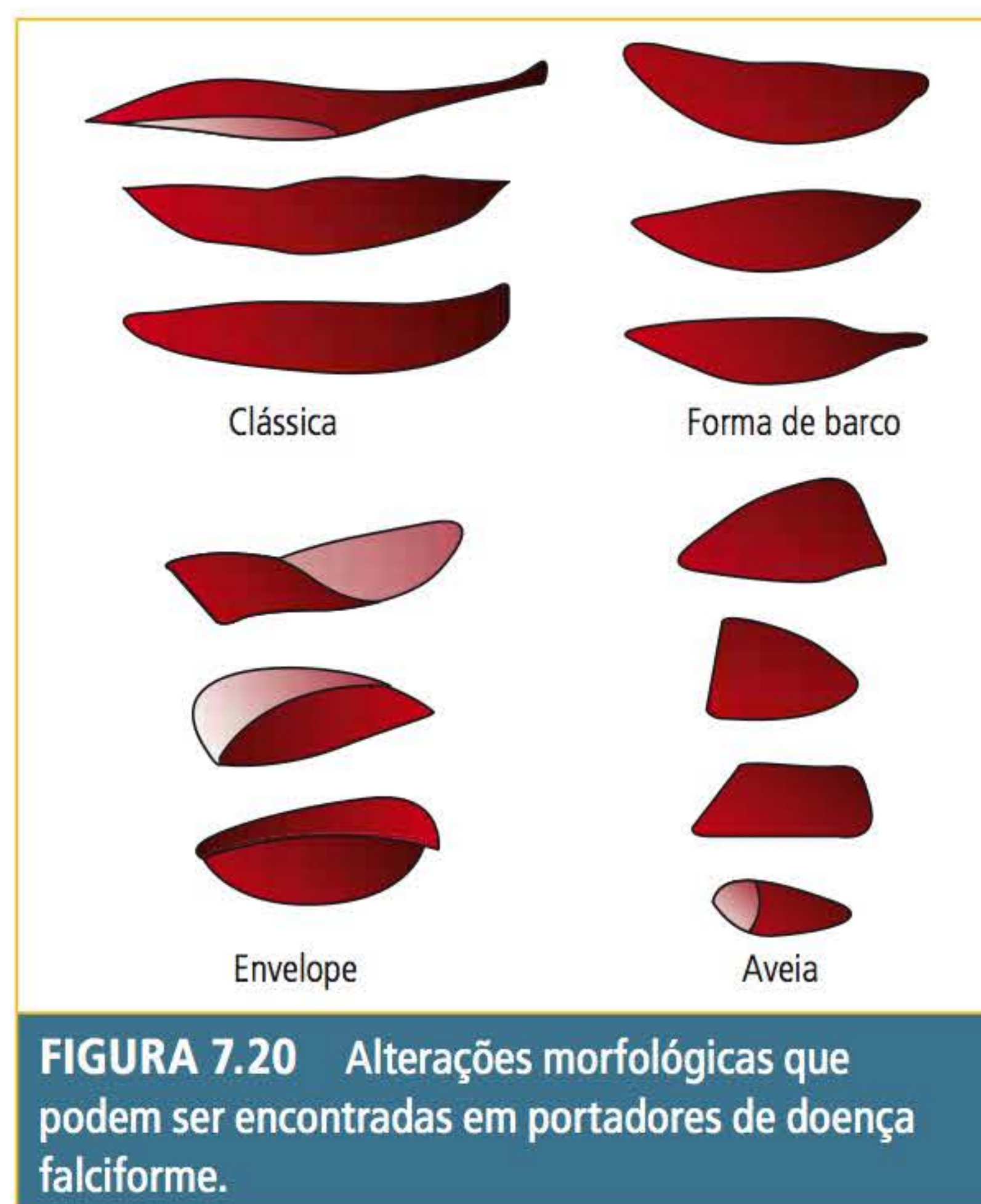
A classificação morfológica da anemia falciforme é normocítica e normocrômica com concentração de hemoglobina que varia entre 5 a 11,0 g/dL, e a classificação fisiológica é hemolítica com hemólise tanto intra quanto extravascular, com aumento de bilirrubina indireta, diminuição da hemoglobina e aumento de reticulócitos<sup>31</sup>. A presença do drepanócito na extensão sanguínea confirma o diagnóstico da anemia falciforme. O número de leucócitos está aumentado de maneira consistente mesmo na ausência de crises oclusivas e de infecções, e a contagem global de leucócitos varia entre 6.000 a 20.000 leucócitos/ $\mu$ L, mantendo-se geralmente entre 12.000 a 15.000 leucócitos/ $\mu$ L. Durante a crise oclusiva, o número de leucócitos e neutrófilos pode elevar-se e, na vigência de um processo infeccioso, o desvio nuclear à esquerda é significativo.<sup>68</sup> A trombocitose é comum<sup>57</sup>.

Na extensão sanguínea, podem ser observadas inúmeras formas falciformes: (1) células alongadas com extremidades pontiagudas (clássica célula em formato de foice); (2) células dobradas, chamadas células-envelope; (3) em meia-lua, nas quais a hemoglobina fica concentrada apenas em uma extremidade da célula; e (4) em forma de aveia, que são células falciformes pequenas, curtas e de formato romboide ou ainda em formas que lembram um barco.<sup>69</sup> A **Figura 7.20** ilustra essas variações de morfologia dos drepanócitos.

Além disso, são observados sinais de eritropoiese acelerada, como policromatofilia, ponteados basófilos, eritroblastos, microesferócitos, codócitos e corpúsculo de Howel-Jolly, que juntamente com os drepanócitos formam o “pacote” morfológico da anemia falciforme.

### Traço falciforme

O traço falciforme raramente está associado a manifestações clínicas ou hematológicas. As contagens sanguíneas são normais, e na extensão sanguínea os drepanócitos não são observados. Os portadores de origem negra do traço falciforme têm valores de VCM menores quando comparados com indivíduos negros sem o traço. Codócitos podem ser observados em alguns casos.<sup>6</sup> Apesar de serem assintomáticos, o diagnóstico de portadores AS é importante sob o ponto de vista do



**FIGURA 7.20** Alterações morfológicas que podem ser encontradas em portadores de doença falciforme.

aconselhamento genético, com relação aos cruzamentos entre portadores com o intuito de evitar novos casos do estado homozigoto da doença.<sup>44</sup> A **Figura 7.21** ilustra o cruzamento de mãe com a mutação falciforme com o pai normal, dando origem ao estado heterozigoto da doença falciforme.

O teste de falcização é positivo, e a eletroforese de hemoglobina revela a presença de duas bandas de hemoglobina, uma na posição de A e outra na posição de S. As únicas situações em que o heterozigoto corre o risco de fazer uma crise de falcização são em casos cirúrgicos, caso seja necessário anestesia geral, locais de grandes altitudes e aviões com cabine sem pressurização.<sup>31</sup>

### Hemoglobinopatia SC

A hemoglobina C é o resultado de uma mutação na qual o ácido glutâmico é substituído pela lisina na sexta posição da cadeia  $\beta$  globínica. Essa hemoglobina é considerada proteína de migração lenta, tendo perfil eletroforético semelhante à fração  $A_2$ . O distúrbio falciforme conhecido como hemoglobinopatia SC resulta da hereditariedade de um gene da HbS de um dos pais e um gene da HbC do outro (**Figura 7.22**).

Nos portadores SC, o número de eritrócitos é maior quando comparados com portadores SS,<sup>70</sup> já que a vida média dos eritrócitos nos pacientes SC é de 18 a 56 dias, significativamente superior que a sobrevivência dos eritrócitos nos pacientes SS.<sup>57</sup>



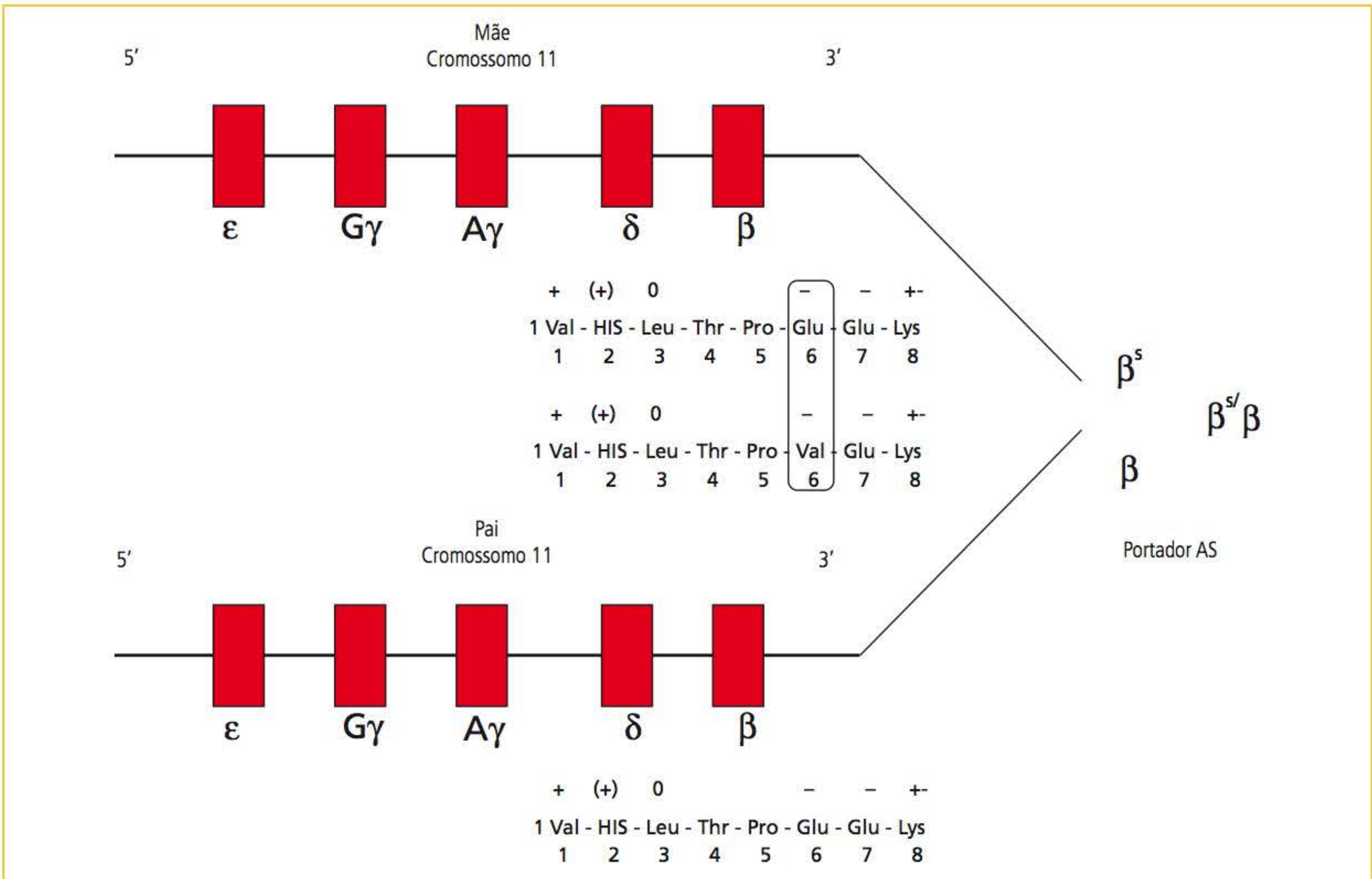


FIGURA 7.21 Exemplo de cruzamento genético entre mãe portadora de mutação falciforme e pai normal dando origem a um filho com traço falciforme (portador AS).

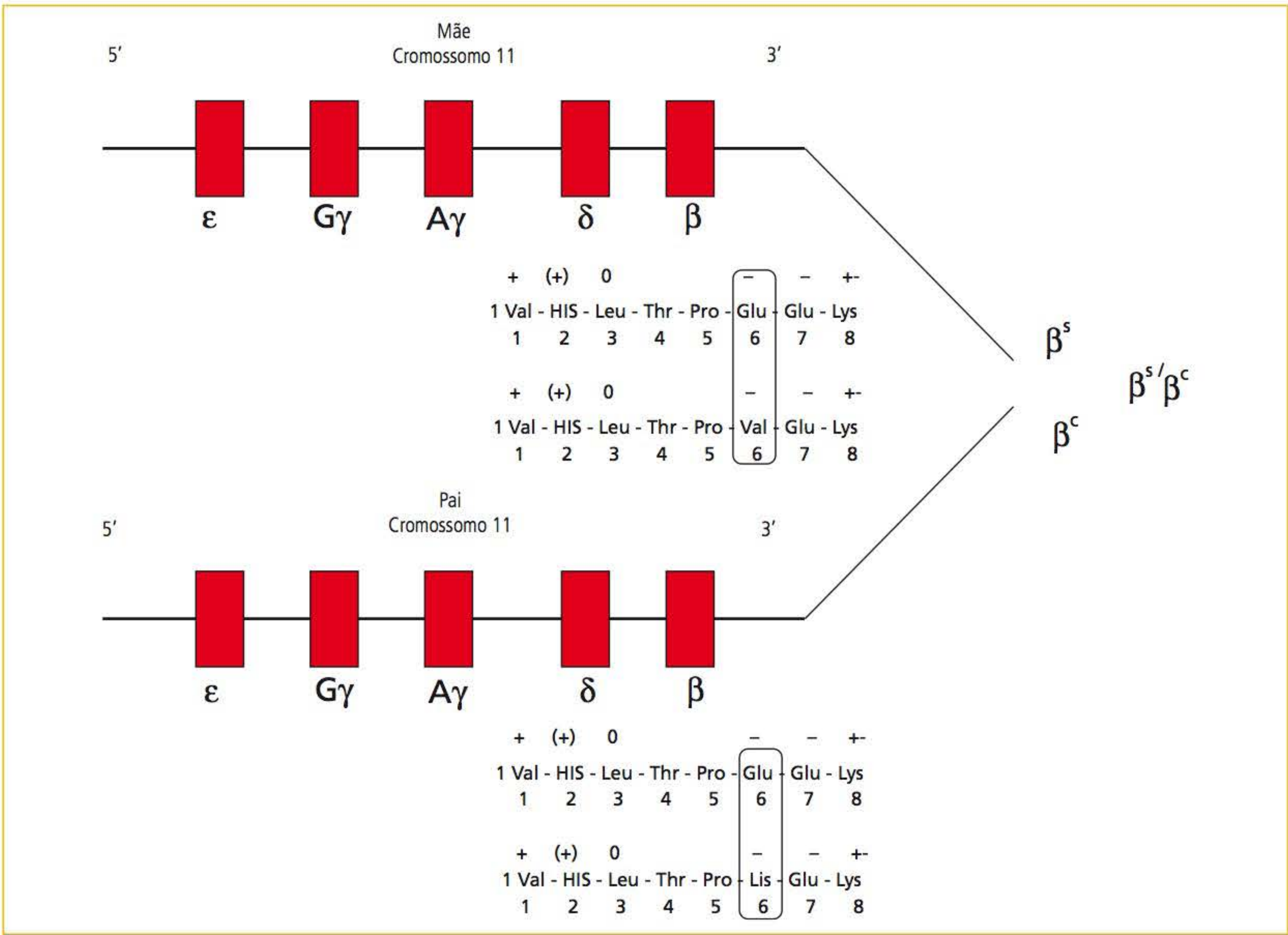


FIGURA 7.22 Cruzamento genético entre um portador de HbS e outro com HbC. Duplo heterozigoto para a HbSC.



A microcitose encontrada na hemoglobinopatia SC é, provavelmente, uma consequência da desidratação da célula (perda de  $K^+$  e água), a qual decorre da interação da HbSC com a membrana celular (possivelmente na banda 3), aumentando, de algum modo, o efluxo do  $K^+$ . Em decorrência disso, ocorre o encolhimento da célula, classificada morfológicamente como xerócito.<sup>71</sup> Ainda pela influência da desidratação do eritrócito, a CHCM é elevada nesses pacientes.<sup>70</sup>

A doença da hemoglobina SC, por ser caracterizada como um estado hemolítico crônico, pode permitir à medula estabelecer mecanismos de compensação, explicando que, exceto em momentos de crise, esses pacientes percorrem sem a expressividade clínica comum das doenças falciformes. Por outro lado, *in vivo*, a cristalização da hemoglobina C somente acontece em condições especiais e raras e sua intensidade não altera de maneira significativa o período de vida do eritrócito.<sup>2</sup>

Outra possível explicação para comportamento de caráter benigno da doença estaria correlacionado com a solubilidade da mistura das formas

desoxi-HbS e desoxi-HbC, que não são diferentes da forma heterozigota da doença falciforme, o portador AS. Portanto, a atividade medular nesta condição demonstra uma capacidade funcional semelhante à encontrada em portadores do traço heterozigoto da doença.<sup>70</sup>

A distinção entre a hemoglobinopatia SC e a anemia falciforme (HbSS) pode ser facilitada pelos achados morfológicos na extensão sanguínea. Na doença HbSC, os drepanócitos são raros, e os sinais hemolíticos, menos pronunciados. Os codócitos são abundantes e eritrócitos irregularmente contraídos podem ser visualizados.

Arai e colaboradores<sup>70</sup> compararam os dados hematimétricos e a contagem automatizada de reticulócitos entre crianças portadoras de HbSS e de HbSC. Em relação à contagem absoluta e relativa dos reticulócitos, o grupo HbSS demonstrou maior atividade eritropoiética em relação ao grupo HbSC. Analisando as frações de imaturidade dos reticulócitos, a quantidade de reticulócitos imaturos foi maior na doença falciforme (HbSS), comprovando o estado hemolítico exacerbado nesta condição (**Tabela 7.4**).

**TABELA 7.4** Valores hematológicos médios de crianças do sexo masculino e feminino com hemoglobina SS, SC e normal

GRUPO	SS		SC		NORMAL	
Sexo	M	F	M	F	M	F
RBC	2,57 (0,62)	2,61 (0,49)	4,45 (0,79)	4,47 (0,56)	4,58 (0,27)	4,64 (0,28)
HB	7,53 (1,01)	7,89 (1,04)	9,94 (0,96)	10,99 (1,44)	13,13 (0,76)	13,26 (0,83)
HCT	22,45 (2,57)	23,39 (3,27)	27,72 (1,64)	30,16 (3,43)	37,85 (1,89)	38,56 (2,12)
VCM	88,81 (10,79)	87,02 (14,47)	64,32 (14,02)	67,92 (6,76)	81,72 (3,18)	82,01 (3,24)
RDW	24,42 (5,33)	20,43 (2,44)	20,14 (3,99)	18,43 (2,29)	13,12 (0,72)	13,04 (0,63)
RET (%)	17,17 (4,86)	17,15 (5,51)	3,67 (1,97)	3,29 (1,29)	0,83 (0,29)	0,82 (0,32)
RET (N)	0,44 (0,13)	0,43 (0,14)	0,15 (0,06)	0,14 (0,04)	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)
IRF (%)	45,91 (11,77)	38,16 (12,09)	30,28 (4,07)	21,23 (4,45)	5,69 (2,95)	5,01 (2,41)
IRF (N)	1,18 (0,41)	0,99 (0,34)	1,32 (0,11)	0,95 (0,30)	-	-
LFR (%)	52,10 (9,92)	59,65 (7,35)	69,72 (4,07)	78,77 (5,49)	94,31 (2,95)	95,00 (2,42)
LFR (N)	1,35 (0,45)	1,56 (0,34)	3,12 (0,72)	3,51 (0,46)	-	-
MRF (%)	39,77 (8,37)	33,23 (5,83)	25,42 (3,65)	17,84 (4,29)	5,20 (2,63)	4,64 (2,30)
MRF (N)	1,01 (0,30)	0,86 (0,19)	1,11 (0,07)	0,80 (0,24)	-	-
HFR (%)	8,13 (1,84)	7,08 (1,61)	4,78 (0,85)	3,38 (1,55)	0,49 (0,69)	0,37 (0,48)
HFR (N)	0,21 (0,08)	0,18 (0,05)	0,21 (0,04)	0,15 (0,07)	-	-

%, contagem relativa; N, contagem absoluta.

Fonte: Adaptada de Arai e colaboradores.<sup>70</sup>



### Hemoglobinopatia S com outras associações

A HbS pode estar associada com outras hemoglobinopatias, entre elas  $\alpha$  e  $\beta$ -talassemia. A associação do traço falciforme ( $\beta^S/\beta^A$ ) com a  $\alpha$ -talassemia menor ( $-\alpha/-\alpha$ ) tem uma concentração de HbS em torno de 25 a 30%. O hemograma mostra uma queda nos valores de VCM e HCM, mas a concentração de hemoglobina é maior que no paciente com  $\alpha$ -talassemia menor, e a contagem de reticulócitos e a bilirrubina indireta são menores.<sup>68</sup> O diagnóstico laboratorial é feito pela queda do VCM e HCM, pela eletroforese de hemoglobina evidenciando uma banda na posição de S e pela pesquisa da hemoglobina H.

A associação da HbS com a  $\beta$ -talassemia pode ser de três tipos: HbS/ $\beta^0$  e HbS/ $\beta^+$ , a última pode apresentar-se de duas formas, uma com manifestação clínica e laboratorial evidente, mas menos grave que a HbS/ $\beta^0$ , e outra com pacientes assintomáticos ou com anemia discreta.<sup>72</sup> A HbS/ $\beta^0$  apresenta uma manifestação clínica e laboratorial semelhante à anemia falciforme. Na HbS/ $\beta^0$ , a hemoglobina varia em torno de 5 a 10 g/dL, a contagem de reticulócitos varia entre 10 a 20%, microcitose, hipocromia, RDW elevado, ponteados basófilos, codócitos, e podem ser vistos drepanócitos.<sup>68</sup> Na forma mais grave da HbS/ $\beta^+$ , a concentração de hemoglobina está entre 7 a 10 g/dL e a contagem de reticulócitos normal ou discretamente elevada. Nas duas formas da HbS/ $\beta^+$ , há microcitose e hipocromia.<sup>68</sup> O diagnóstico laboratorial é feito pela microcitose e hipocromia e pela eletroforese de hemoglobina com dosagem de hemoglobinas  $A_2$  e fetal. Na eletroforese, a concentração da fração  $A_2$  é normal ou aumentada, a hemoglobina fetal pode chegar a concentrações de até 40% e a hemoglobina S predomina, com concentrações acima de 50%.<sup>73</sup>

### Hemoglobinopatia C

A HbC resulta de uma mutação de ponto no DNA em que ocorre a troca de uma guanina por uma adenina (G→A). A sequência de bases nitrogenadas no ácido glutâmico é GAG, a mutação resulta no códon AAG, que significa o aminoácido lisina. A consequência dessa mutação é cristalização da hemoglobina na parte central do eritrócito, que, em termos morfológicos, caracteriza o codócito (célula em alvo). O homozigoto para a hemoglobina C (HbCC) clinicamente pode apresentar dor

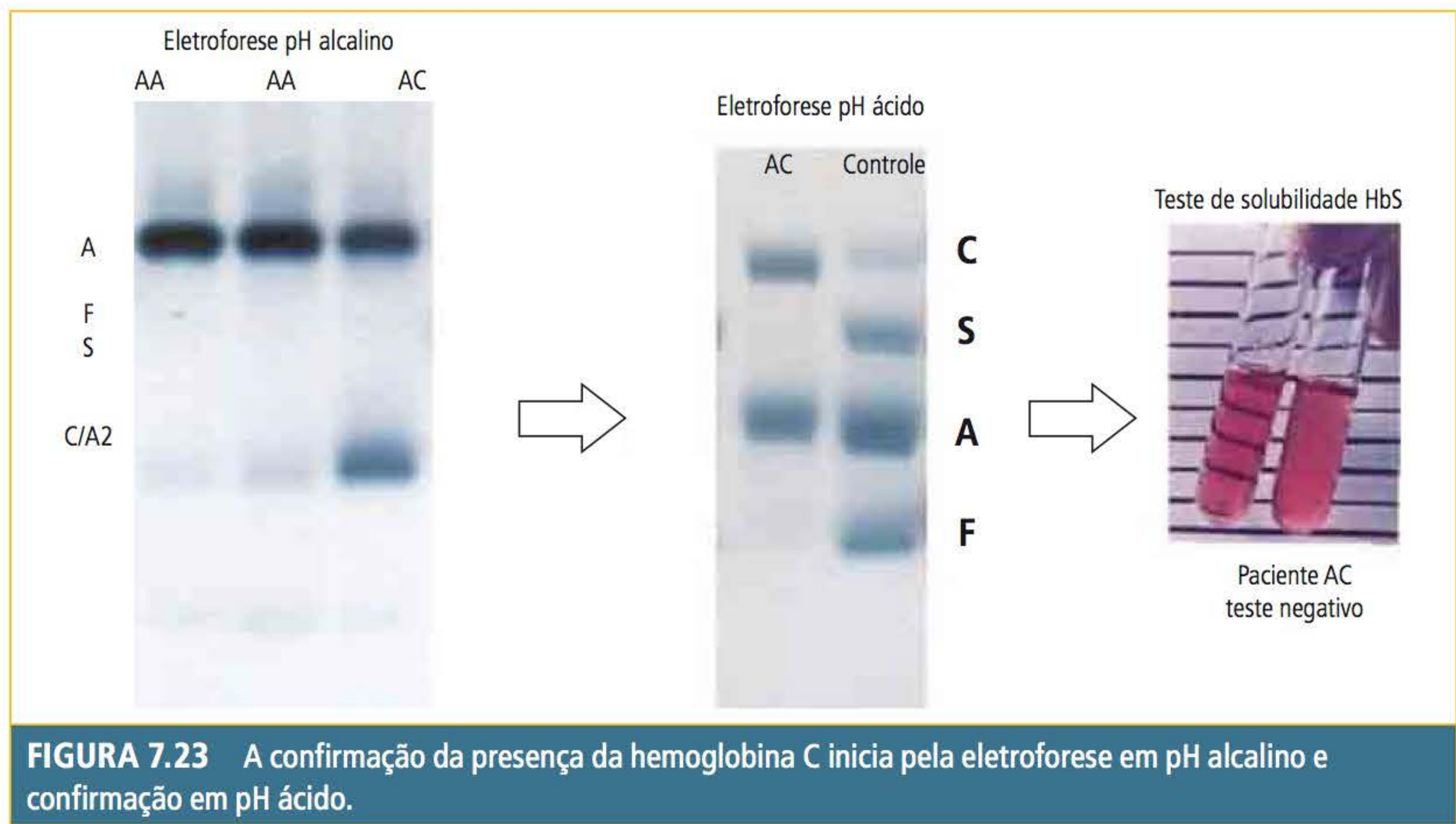
abdominal, artralgia e cefaleia, sintomas que não estão diretamente relacionados a distúrbios genéticos de hemoglobina. O hemograma apresenta, na extensão sanguínea, abundância de codócitos (até 90%).<sup>31</sup> A herança é autossômica recessiva.

A anemia é leve a moderada e, além dos codócitos, podem ser observados eritrócitos irregularmente contraídos, que podem lembrar esferócitos, mas pelo seu formato irregular descartam esta possibilidade.<sup>6</sup> Pode haver policromatofilia, e é rara a presença de eritroblastos. O portador AC é assintomático e apresenta como achado hematológico, na extensão sanguínea, a presença de 5 a 30% de codócitos. A contagem de reticulócitos varia entre 2 a 6%.<sup>31</sup> O diagnóstico é feito pela eletroforese de hemoglobina em pH ácido e alcalino. Na eletroforese alcalina, a presença de hemoglobina C é revelada por uma corrida eletroforética na posição da fração  $A_2$ , porém em concentração muito superior. As hemoglobinas  $C_{\text{Harlem}}$  e hemoglobina E migram na mesma posição da HbC e da fração  $A_2$  em soluções alcalinas. A diferenciação pode ser realizada pela eletroforese em pH ácido, em que a hemoglobina E tem migração eletroforética semelhante à da hemoglobina A. Com relação à hemoglobina  $C_{\text{Harlem}}$ , a diferenciação se dá pela positividade desta hemoglobina no teste de solubilidade, o que não ocorre com a hemoglobina C, que é solúvel.<sup>73</sup> A **Figura 7.23** ilustra a sequência de testes que confirmam a presença da hemoglobina C.

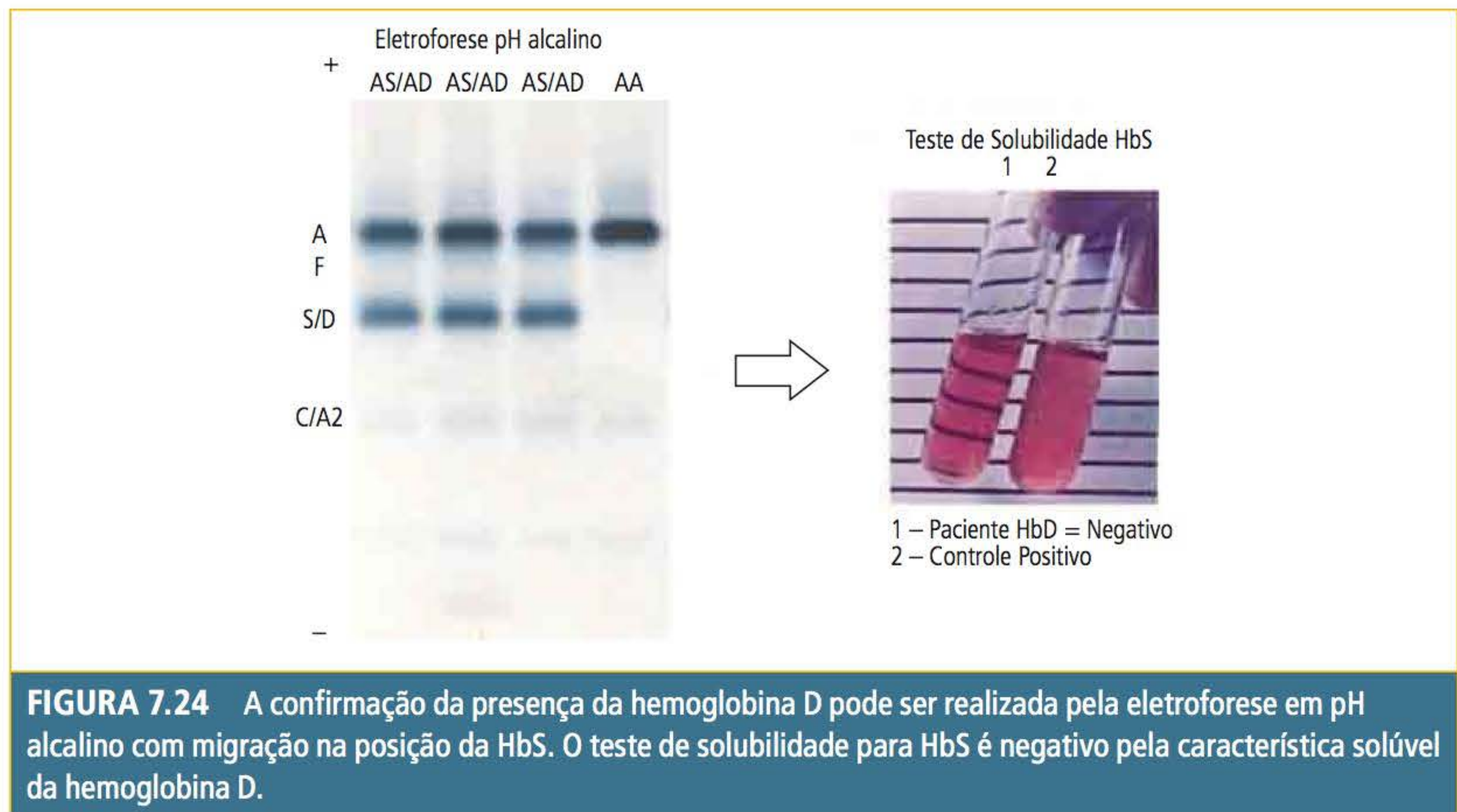
### Hemoglobinopatia D

A hemoglobina D tem mobilidade eletroforética idêntica à da HbS em pH alcalino. Ela pode ser distinguida da HbS por sua solubilidade normal ou por uma migração eletroforética em pH ácido junto a hemoglobina A. A hemoglobina D-Punjab (também conhecida como HbD-Los Angeles) é a mais comum das variantes da hemoglobina D. Pacientes homozigotos para a HbD (HbDD) apresentam anemia hemolítica leve. A eletroforese de hemoglobina apresenta 95% de hemoglobina D e quantidades normais de hemoglobina fetal e  $A_2$ . O estado heterozigoto não está relacionado a nenhuma anormalidade clínica, hematológica ou fisiológica.<sup>51</sup> Seu diagnóstico tem como importância maior o aconselhamento genético para evitar cruzamentos com portadores assintomáticos de outras hemoglobinopatias.<sup>73</sup> A **Figura 7.24** exemplifica a confirmação da presença da hemoglobina





**FIGURA 7.23** A confirmação da presença da hemoglobina C inicia pela eletroforese em pH alcalino e confirmação em pH ácido.



**FIGURA 7.24** A confirmação da presença da hemoglobina D pode ser realizada pela eletroforese em pH alcalino com migração na posição da HbS. O teste de solubilidade para HbS é negativo pela característica solúvel da hemoglobina D.

D por meio da eletroforese alcalina e do teste de solubilidade para HbS.

### Hemoglobinopatia E

A hemoglobina E é comum no sudeste asiático, sendo a segunda hemoglobina variante mais prevalente no mundo.<sup>51</sup> A alteração responsável pela formação dessa hemoglobina variante é a troca do ácido glutâmico pela lisina na posição 26 da cadeia  $\beta$ .<sup>73</sup> Ao contrário de outras hemoglobinas variantes, as síndromes da HbE são caracterizadas

pela microcitose e hipocromia, presença de codócitos e células irregularmente contraídas.<sup>6</sup> O eritrograma é semelhante ao quadro apresentado na  $\beta$ -talassemia menor. O traço para hemoglobina E (portador AE) é totalmente assintomático, e seu diagnóstico é importante para fins de aconselhamento genético. Tem migração eletroforética em pH alcalino semelhante à hemoglobina C, sendo diferenciado pela eletroforese em pH ácido, em que a hemoglobina E migra junto à hemoglobina A.



### Métodos laboratoriais para o diagnóstico das hemoglobinopatias e talassemias

As hemoglobinopatias e as talassemias são doenças genéticas comuns e que são reconhecidamente um problema de saúde pública. Portanto, pacientes com suspeita de serem portadores de alguma dessas alterações genéticas precisam ser analisados com critério por meio de vários testes laboratoriais para a definição do seu diagnóstico. Parâmetros como VCM e RDW alterados, alterações morfológicas específicas como hipocromia, pontado basófilo, eritroblastos, codócitos e drepanócitos devem servir de “alerta” para a pesquisa da causa de sua presença quando evidenciados no eritrograma. Entre os métodos que são utilizados no diagnóstico das hemoglobinopatias e das talassemias, podem-se destacar:

- 1) Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e em pH ácido;
- 2) Quantificação da fração  $A_2$ ;
- 3) Pesquisa de hemoglobina S (teste de falcização e teste de solubilidade);
- 4) Determinação da concentração de hemoglobina fetal;
- 5) Determinação da concentração da meta-hemoglobina;
- 6) Teste de precipitação pelo isopropanol para hemoglobinas instáveis; e
- 7) Pesquisa de corpos de Heinz e precipitados de hemoglobina H.

Além desses testes, atualmente métodos totalmente automatizados, como os que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a focalização isoeletrica (FI), têm melhorado o desempenho para o diagnóstico dessas anormalida-

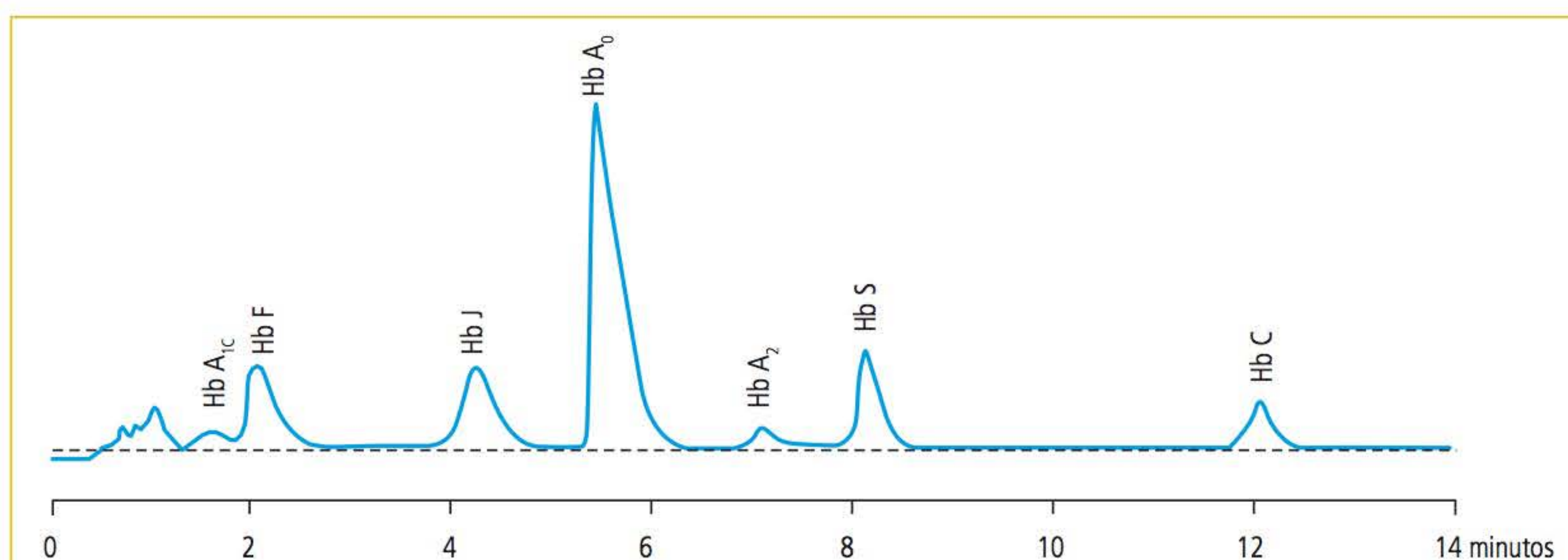
des relacionadas à hemoglobina. A focalização isoeletrica tem bom desempenho na separação da hemoglobina fetal (HbF) da hemoglobina A (HbA), e na identificação de hemoglobinas variantes, como A, S, D-Punjab e O-arábico. Porém, essa técnica tem limitações na quantificação da hemoglobina  $A_2$ . A HPLC pode ser usada para a quantificação da hemoglobina S,  $A_2$  e F e para a detecção e quantificação da maioria das hemoglobinas variantes. Pela precisão na quantificação da fração,  $A_2$  é o método de escolha para o diagnóstico da  $\beta$ -talassemia menor. Em comparação com a eletroforese em pH alcalino que utiliza fitas de acetato de celulose, o HPLC apresenta as seguintes vantagens:

- 1) Por ser automatizado, permite a realização de várias amostras em menor período de tempo;
- 2) Pequeno volume necessário para a realização do teste;
- 3) Quantificação das hemoglobinas normais e variantes com maior precisão e confiabilidade.

Mesmo assim, algumas hemoglobinas podem ser eluídas conjuntamente, e a interpretação dessas situações requer profissionais com ampla experiência e treinamento no uso do equipamento. A **Figura 7.25** ilustra como as principais hemoglobinas são separadas por HPLC.

### Eletroforese de hemoglobina

A eletroforese de hemoglobina é um teste antigo, muito útil na rotina laboratorial, porém é cada vez menos realizado pelos laboratórios, que em sua maioria optam por tercerizar o teste em laborató-



**FIGURA 7.25** Padrão de separação de algumas hemoglobinas por HPLC.



rios de apoio. A opção de ter um sistema simples para realizar eletroforese alcalina de hemoglobina é ferramenta decisiva para esclarecer dúvidas em relação a alterações de parâmetros hematimétricos ou alguma alteração morfológica. Um exemplo disto seria a visualização de codócitos em abundância na extensão sanguínea; uma corrida eletroforética de 20 a 30 minutos poderia esclarecer o motivo desta alteração.

Tecnicamente, a eletroforese pode ser considerada um teste de fácil realização. Para a detecção das hemoglobinopatias, a eletroforese em pH alcalino é o procedimento de escolha, seguido da eletroforese em pH ácido, que é metodologia complementar para a definição de algumas hemoglobinas anormais. O material laboratorial necessário para um sistema de eletroforese necessita de uma fonte de energia, uma cuba eletroforética e fitas de acetato de celulose (Figura 7.26).

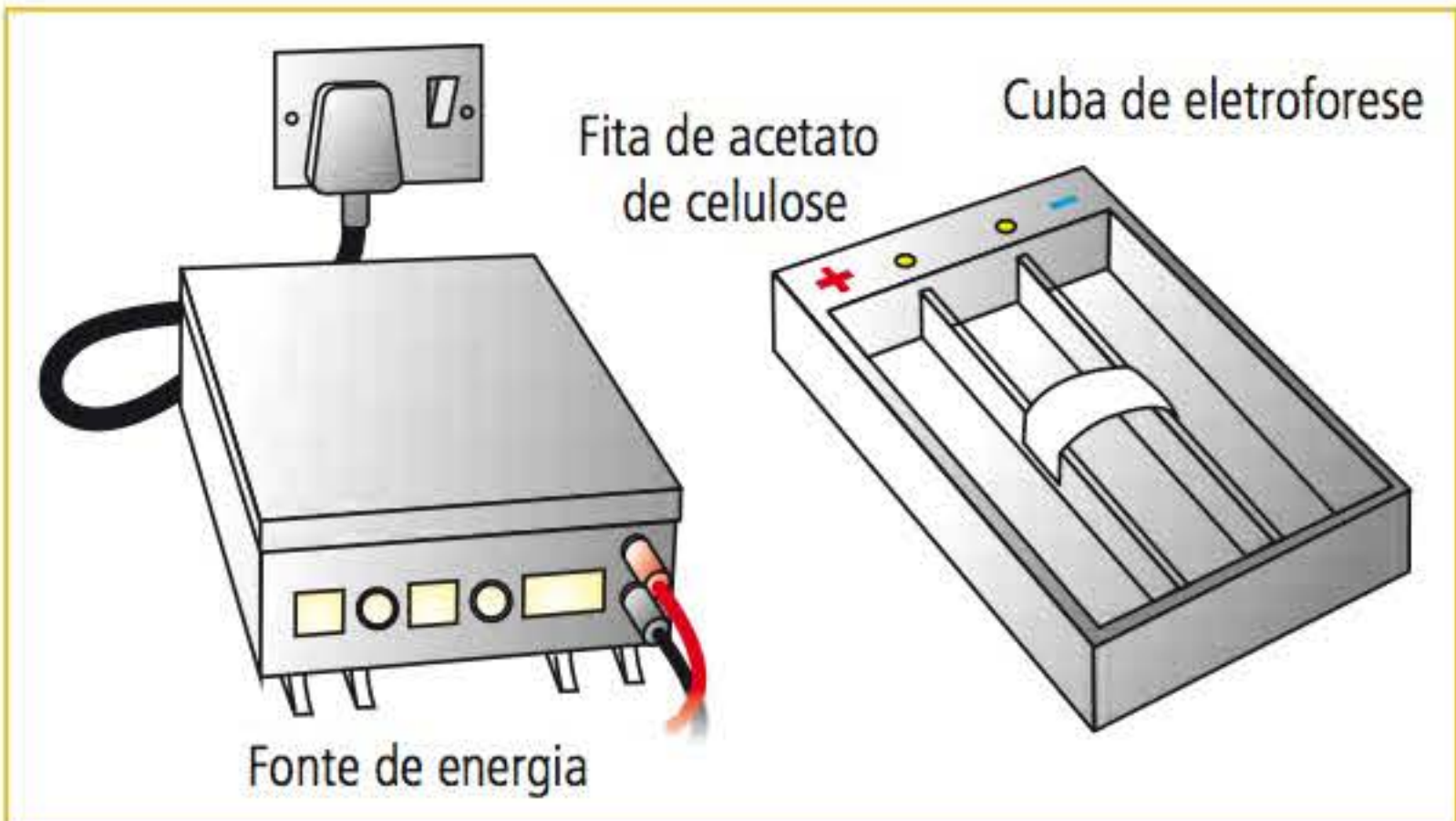


FIGURA 7.26 Material necessário para um sistema básico de eletroforese.

Existem sistemas semiautomatizados e inteiramente automatizados no mercado, que são mais complexos e dispendiosos, mas o princípio da eletroforese permanece o mesmo. As proteínas, como a hemoglobina, são compostas por grupos de caráter ácido (COOH-) e básicos (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) e sua carga depende do pH da solução tampão em que essa proteína está dissolvida, podendo ter carga negativa em tampões alcalinos, quando os grupamentos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> estão neutralizados, com predomínio dos grupos COOH-; ou ao contrário, em tampões ácidos, em que os grupamentos COOH- estão neutralizados, carrega-se a proteína de carga positiva pelo excesso de NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.

Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino

Em pH alcalino, a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, migrando em direção ao

polo positivo. Esse método identifica as hemoglobinas normais e grande parte das hemoglobinas variantes. As diferentes mobilidades verificadas entre as diversas hemoglobinas com defeitos estruturais devem-se às alterações de cargas elétricas, causadas por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoeletricos (pI). As hemoglobinas variantes oriundas de mutações que não alteram o ponto isoeletrico da proteína geralmente apresentam mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina A, que são classificadas como hemoglobinas instáveis. A eletroforese permite a identificação das hemoglobinas A, F, S/G/D, C/E/O Árabe, H e um número de variantes de hemoglobinas menos comuns. A diferenciação entre hemoglobinas que migram em posições semelhantes na eletroforese alcalina pode ser obtida usando a eletroforese em pH ácido, por HPLC e pela focalização isoeletrica.

A Figura 7.27 ilustra o comportamento das principais hemoglobinas normais e anormais encontradas na rotina laboratorial. Entre as hemoglobinopatias mais comuns no Brasil, destacam-se as hemoglobinas S e C. Como já comentado anteriormente, o padrão eletroforético de um indivíduo normal adulto é apresentar entre 95 a 97% de hemoglobina A, abaixo de 3,5% de hemoglobina A<sub>2</sub> e concentração de hemoglobina fetal menor que 1%.

ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA PH ALCALINO					
+	A	F	S	C/A <sub>2</sub>	-
	■	■	■	■	Padrão eletroforético normal
	■				Hemoglobina AA – normal
	■		■		Portador AS
			■		Hemoglobinopatia SS
	■			■	Portador AC
				■	Hemoglobinopatia CC
			■	■	Hemoglobinopatia SC
		■			Hemoglobina fetal

FIGURA 7.27 Padrão eletroforético comparativo das principais hemoglobinas em pH alcalino.

O método tradicional utilizando fitas de acetato de celulose possui algumas limitações, como a dificuldade da separação de algumas hemoglobinas que migram em posições próximas. Exemplos disto são a hemoglobina A e hemoglobina fetal. Nestes casos, a concentração de hemoglobina fetal



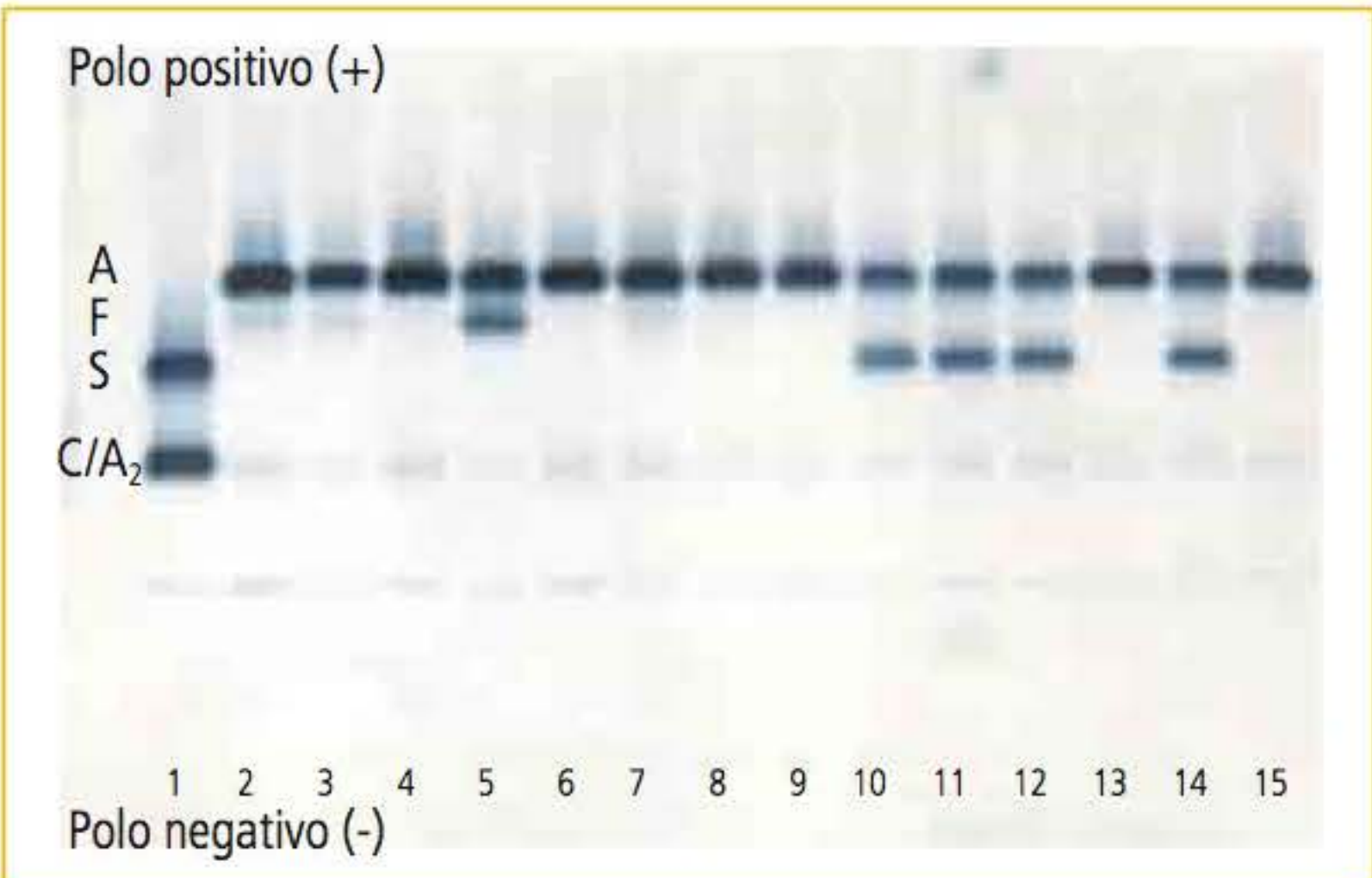
deve ser realizada por outro método. A **Figura 7.28** ilustra uma corrida eletroforética, demonstrando a separação entre as hemoglobinas A e S.



**FIGURA 7.28** Padrão eletroforético de um indivíduo portador de hemoglobina S (AS) (à esquerda) e de um indivíduo normal (AA).

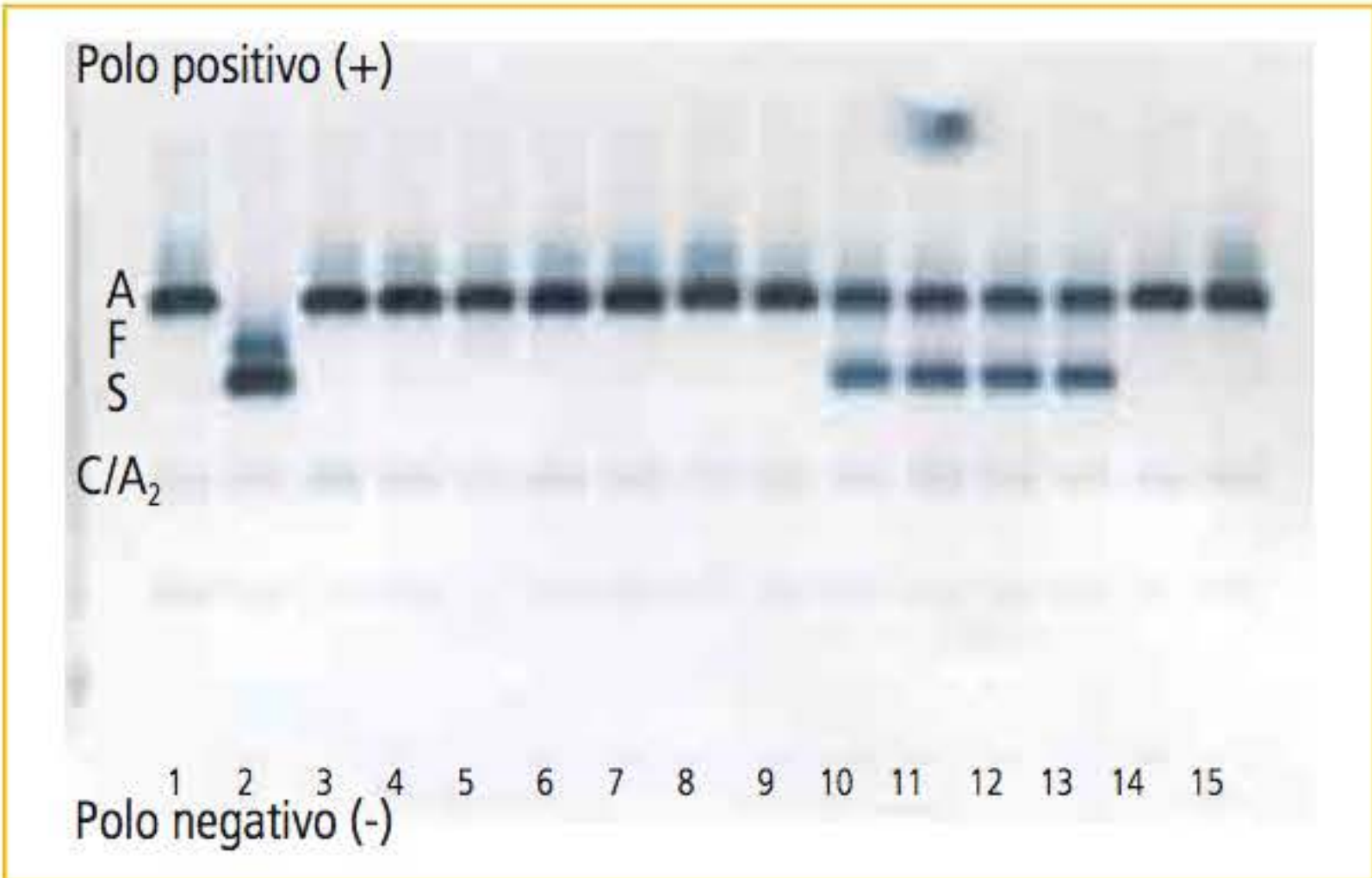
Alguns sistemas semiautomatizados de eletroforese tendem a ter melhor diferenciação na identificação da maioria das hemoglobinas. Um exemplo disto são os sistemas compactos Hidrasys® e Hidrasys 2® fabricados pela Sebia. A utilização de um gel de agarose possibilita boa separação entre a maioria das hemoglobinas. A concentração das hemoglobinas é determinada por densitometria. As **Figuras 7.29 a 7.32** ilustram corridas eletroforéticas realizadas no sistema Hidrasys.

**Eletroforese em acetato de celulose em pH ácido**  
O emprego da eletroforese em pH 6,2 é específico para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a hemoglobina A, quais sejam: hemoglobina S da hemoglobina D e hemoglobina



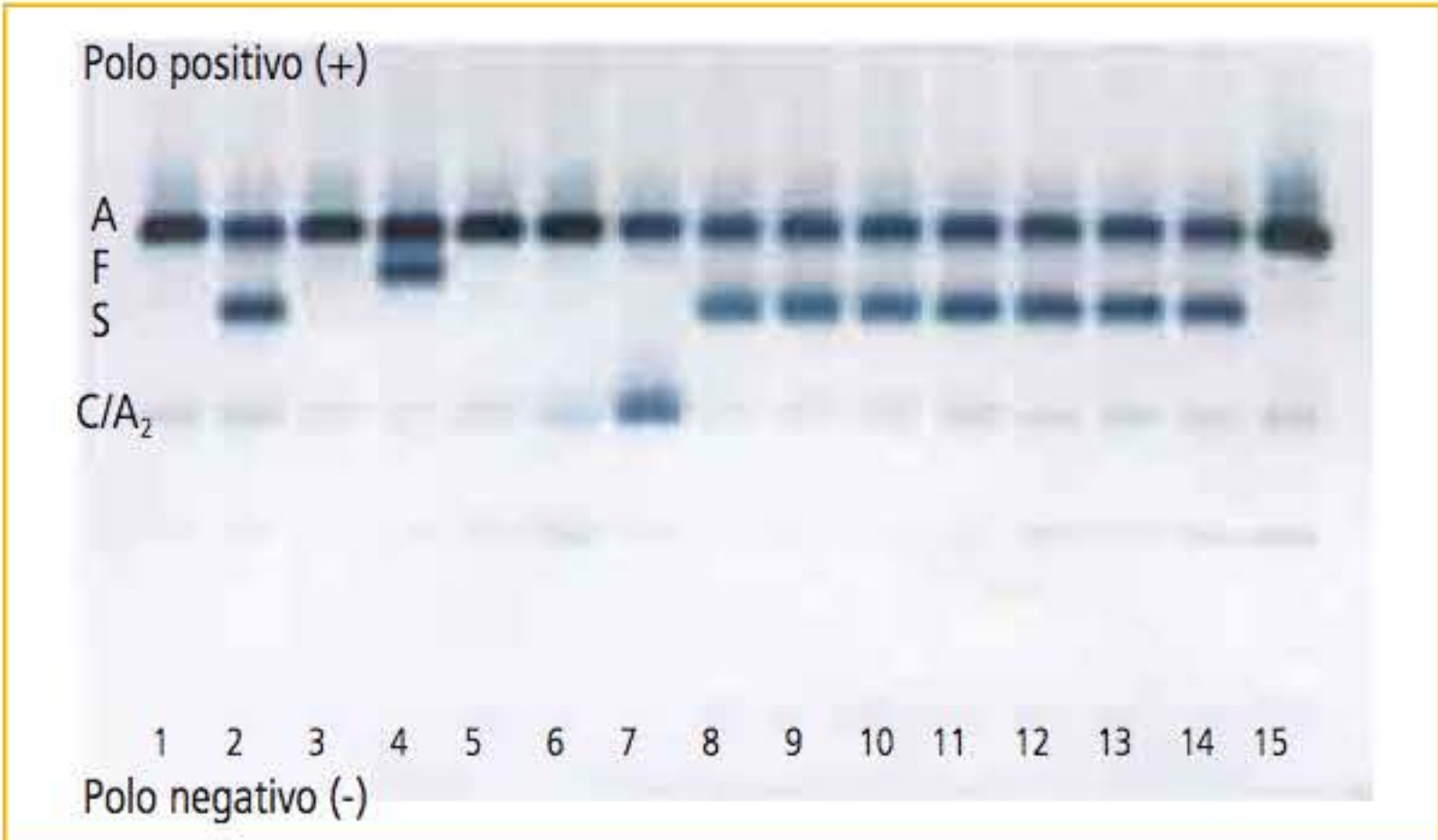
**FIGURA 7.29** Corrida eletroforética em gel de agarose (pH alcalino) no sistema Hidrasys.

**Nota:** Corrida eletroforética 1, presença de hemoglobina S e C (hemoglobinopatia SC); corrida 5 = aumento de hemoglobina fetal; corridas 10 a 12 = presença de hemoglobina A e S (portador AS).



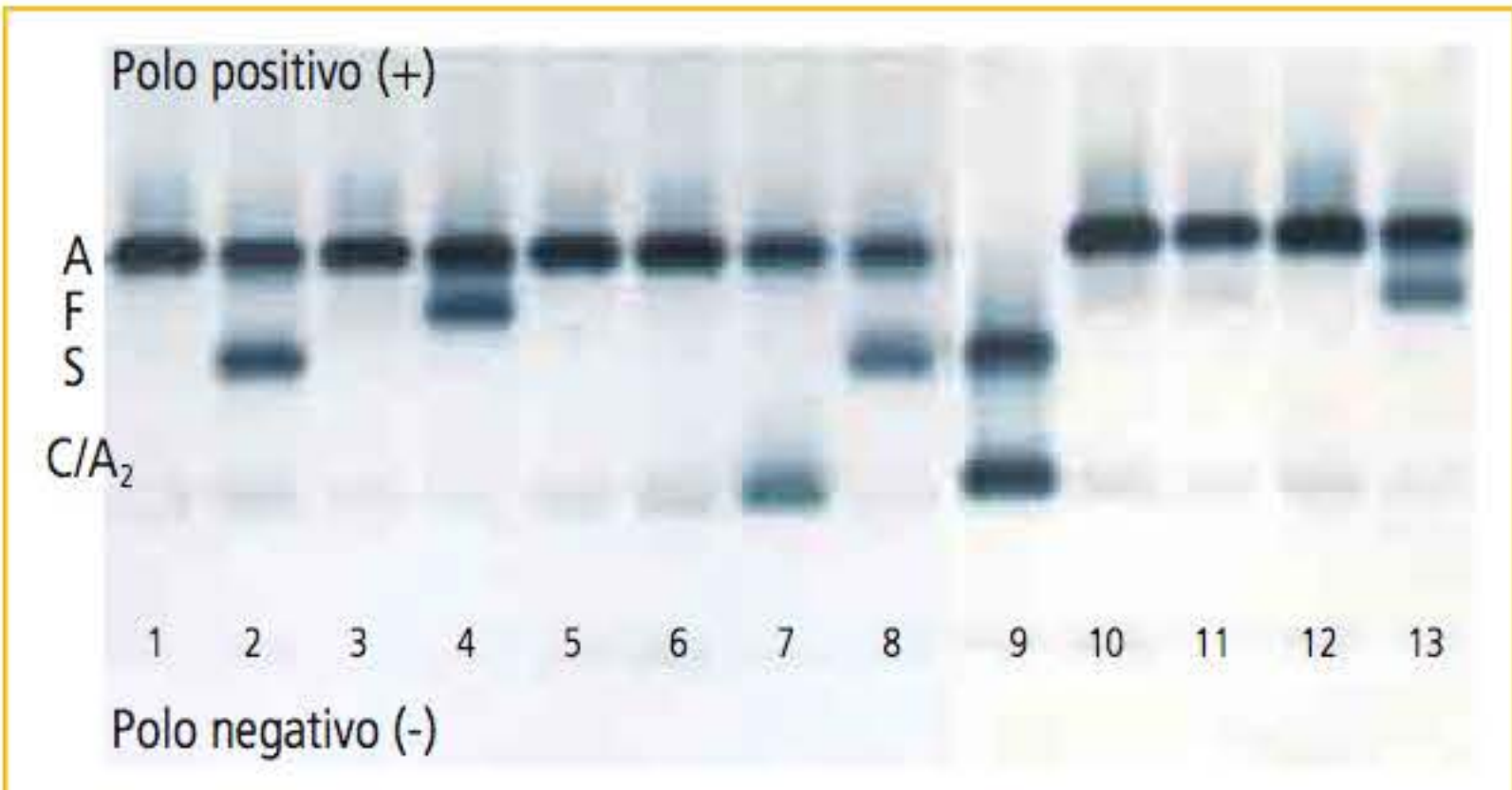
**FIGURA 7.30** Corrida eletroforética em gel de agarose (pH alcalino) no sistema Hidrasys.

**Nota:** Corrida eletroforética 2 = presença de hemoglobina S com aumento de hemoglobina fetal (hemoglobinopatia SS); corridas 3 a 9 = normal (AA); corridas 10 a 13 = presença de hemoglobina A e S (portador AS).



**FIGURA 7.31** Corrida eletroforética em gel de agarose (pH alcalino) no sistema Hidrasys.

**Nota:** Corrida eletroforética 2 = presença de hemoglobina A e S (portador AS); corrida 4 = aumento de hemoglobina fetal; corrida 7 = presença de hemoglobina A e C (portador AC); corridas 8 a 14 = presença de hemoglobina A e S (portador AS).

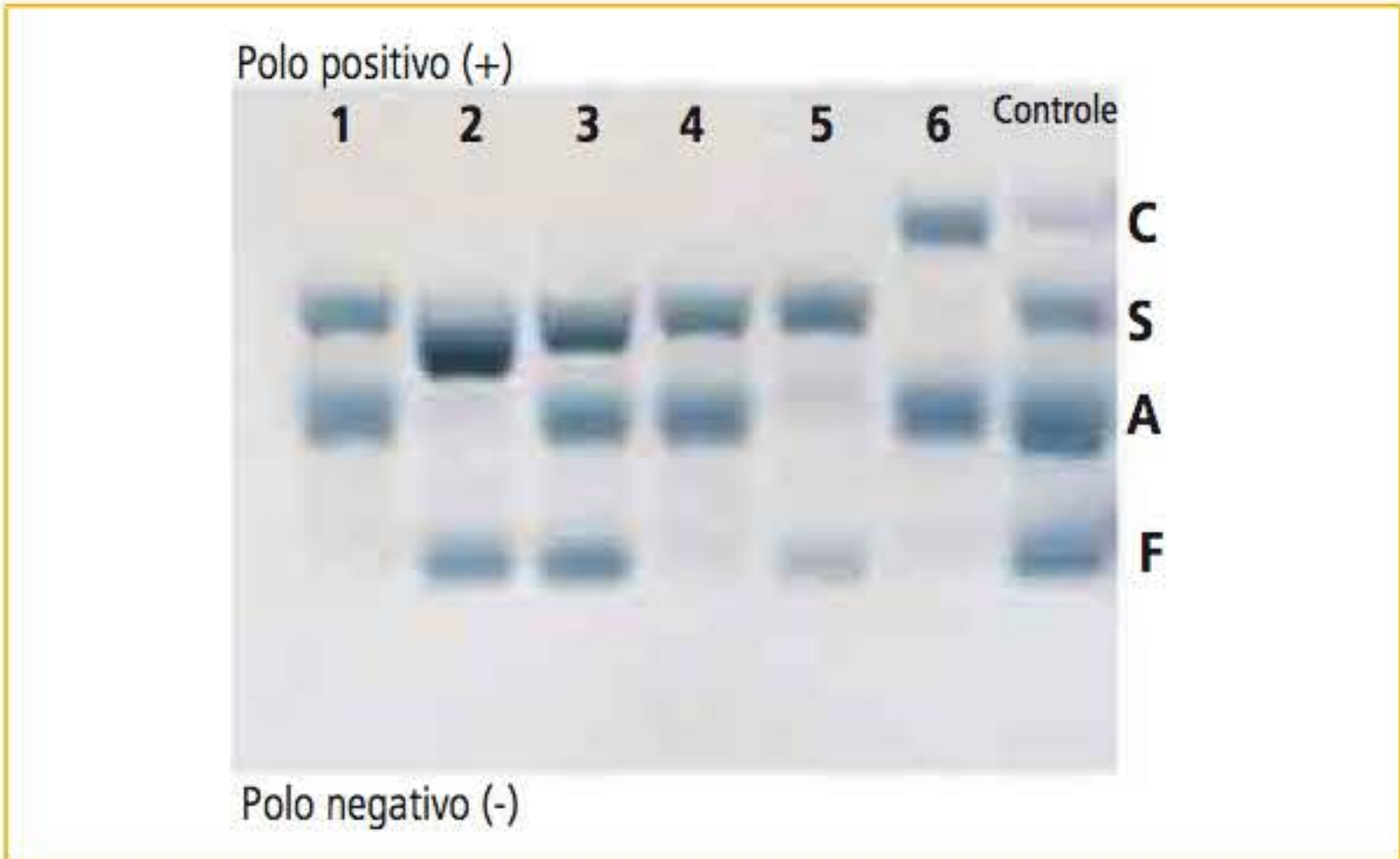


**FIGURA 7.32** Corrida eletroforética em gel de agarose (pH alcalino) no sistema Hidrasys.

**Nota:** Corrida eletroforética 1 = normal; corrida 2 = presença de hemoglobina A e S (portador AS); corrida 3 = normal; corrida 4 = aumento de hemoglobina fetal; corridas 5 e 6 = Normal; corrida 7 = presença de hemoglobina A e C (portador AC); corrida 8 = presença de hemoglobina A e S (portador AS); corrida 9 = presença de hemoglobina S e C (hemoglobinopatia SC); corridas 10 a 12 = normal e corrida 13 = aumento de hemoglobina fetal.



C da hemoglobina E, que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino. Por essa técnica, as hemoglobinas S e C separam-se da hemoglobina A, enquanto as hemoglobinas D e E migram na mesma posição da hemoglobina A. A **Figura 7.33** demonstra as posições das principais hemoglobinas em gel de agarose pelo sistema fornecido pelos sistemas Hidrasys em pH ácido.



**FIGURA 7.33** Corrida eletroforética das principais hemoglobinas em gel de agarose em pH ácido.

**Nota:** Corrida eletroforética 1 = presença de hemoglobina A e S (portador AS); corrida 2 = presença de hemoglobina S com aumento de hemoglobina fetal (hemoglobinopatia SS); corrida 3 = presença de hemoglobina S com aumento de hemoglobina fetal (hemoglobinopatia SS) de paciente que sofreu transfusão sanguínea (presença de hemoglobina A); 4 = presença de hemoglobina A e S (portador AS); corrida 5 = presença de hemoglobina S com aumento de hemoglobina fetal (hemoglobinopatia SS); corrida 6 = presença de hemoglobina A e C (portador AC).

A **Tabela 7.5** demonstra a interpretação de algumas hemoglobinopatias a partir do perfil ele-

troforético em pH alcalino e ácido, além do teste de solubilidade para a hemoglobina S.

**Pesquisa de hemoglobina S (testes de solubilidade e falcização)**

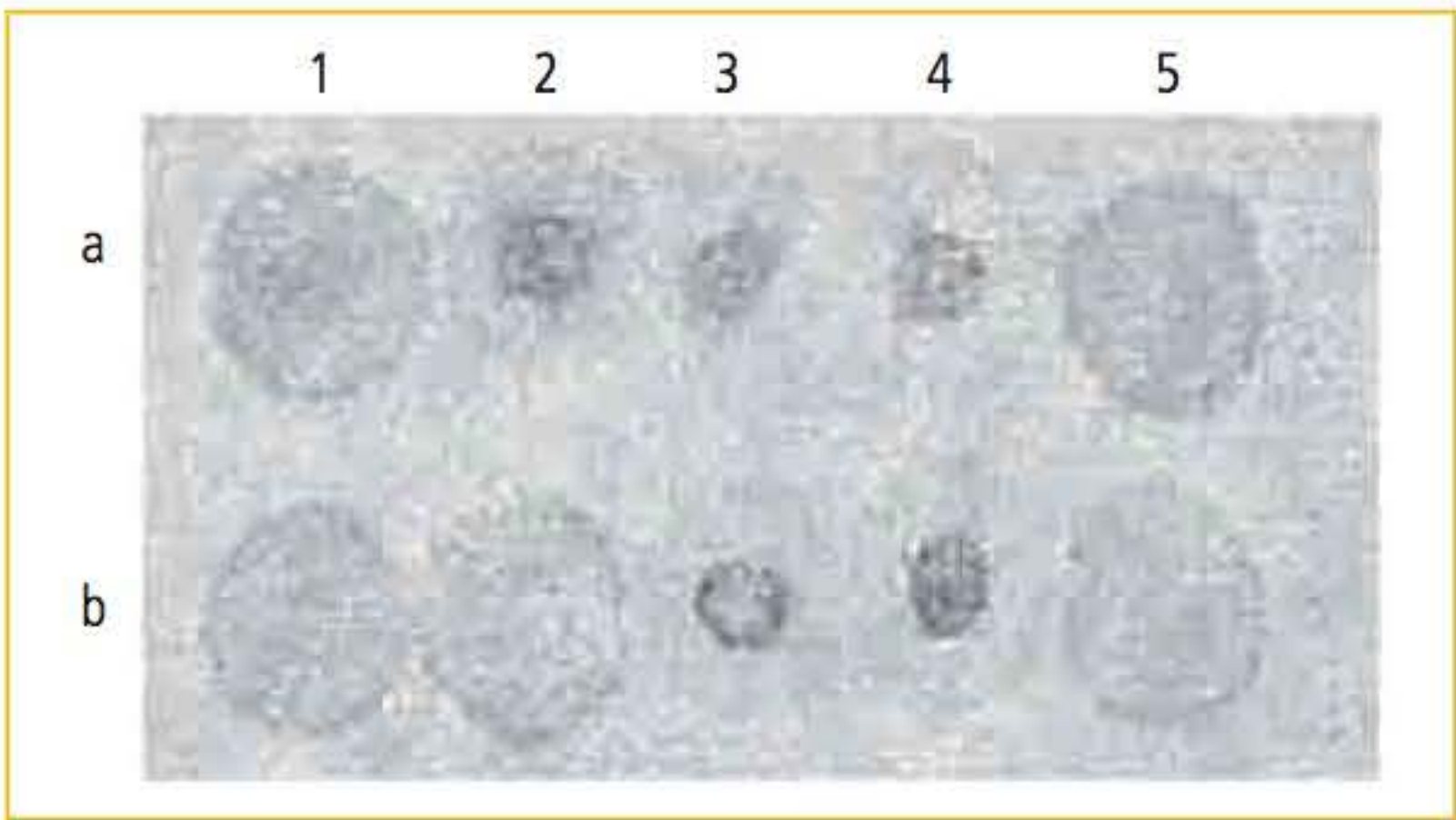
A hemoglobina S (HbS) é uma hemoglobina variante, decorrente da mutação pontual na posição 6 do gene da cadeia  $\beta$ , com consequente alteração nas propriedades físico-químicas da molécula. A troca de aminoácidos que resulta na HbS modifica a estrutura da molécula, pois o ácido glutâmico na posição 6 da globina  $\beta$  auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas das hemoglobinas. A entrada da valina nessa posição favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio, diminuindo sua solubilidade.<sup>74</sup>

No teste de solubilidade, a HbS é dissolvida em solução de alta molaridade, o que predispõe à sua desoxigenação e formação de polímeros insolúveis. A insolubilidade pode ser observada pela retenção da solução em papel de filtro ou na sua turvação na solução (**Figuras 7.34 e 7.35**).

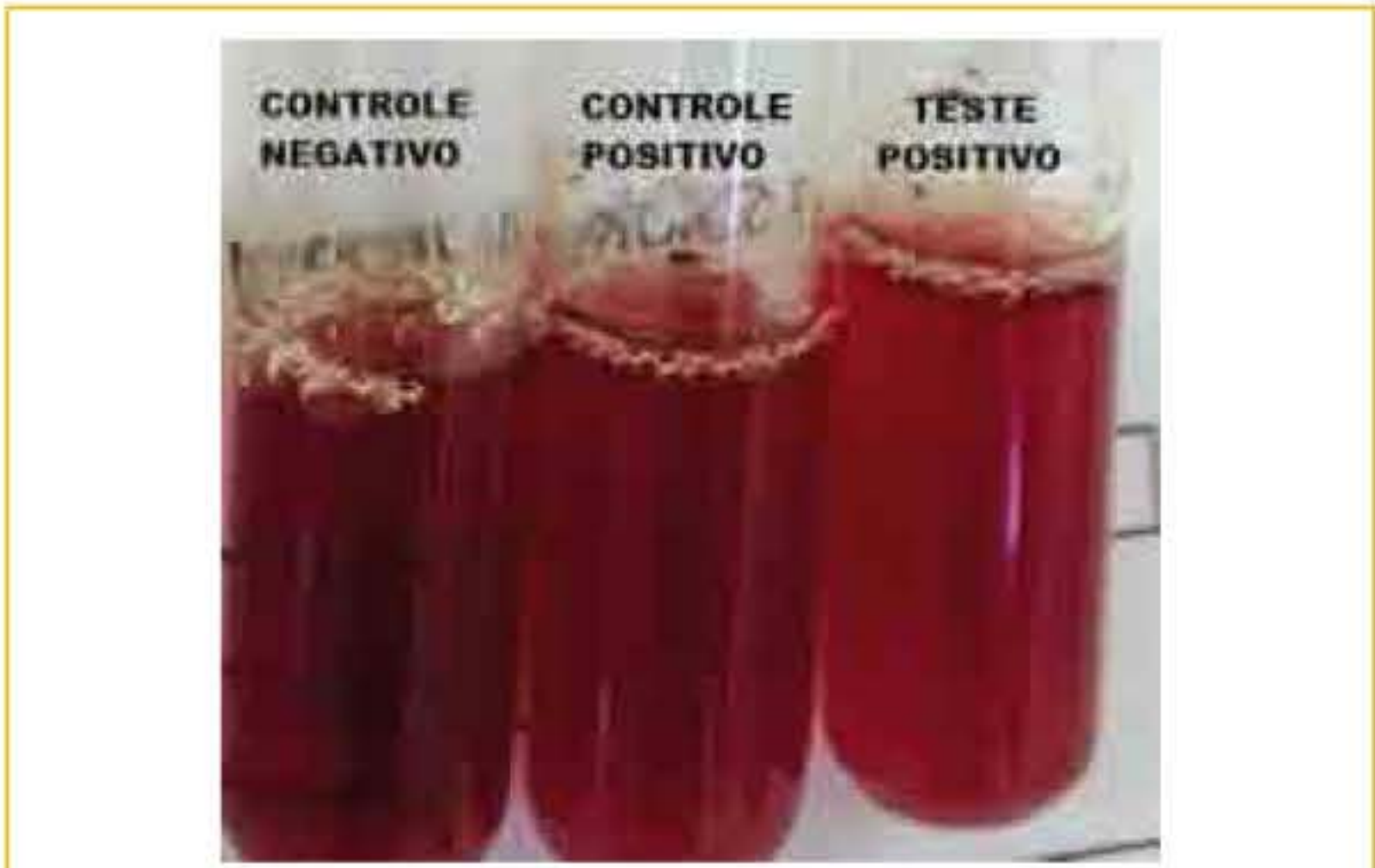
Ao contrário da hemoglobina S, as hemoglobinas normais (HbA e HbA<sub>2</sub>) e as variantes comuns, como HbC, HbD, HbE, HbN e HbJ, são solúveis. É um teste exclusivamente utilizado apenas para detectar a presença de HbS.<sup>75</sup> O teste pode detectar concentrações de hemoglobina S abaixo de 20%, o que é suficiente para determinar a maioria dos casos de portadores do traço falciforme (portador AS). Quando positivo, o teste deve ser confirmado com outro teste confirmatório, como a HPLC, FI e a

TABELA 7.5 Perfil eletroforético das principais hemoglobinopatias em pH ácido e alcalino e o comportamento pelo teste de solubilidade										
	ELETROFORESE pH ALCALINO				ELETROFORESE pH ÁCIDO					
	+		-		+		-			
	A	F	S	C	C	S	A	F		
CONTROLE	•	•	•	•	•	•	•	•	SOLUBILIDADE HBS	RESULTADO
Paciente 1	•		•			•	•		Positivo	Portador AS
Paciente 2	•		•				•		Negativo	Portador AD
Paciente 3			•			•			Positivo	Hb SS
Paciente 4			•			•	•		Positivo	Hb SD
Paciente 5	•		•	•		•	•		Positivo	Hb ASE
Paciente 6	•		•	•			•		Negativo	Hb ADE
Paciente 7	•			•	•		•		Negativo	Portador AC
Paciente 8	•			•			•		Negativo	Portador AE





**FIGURA 7.34** Retenção da hemoglobina S em papel de filtro. A positividade para a presença da hemoglobina S é vista nas colunas 2a, 3a, 4a, 3b e 4b.



**FIGURA 7.35** Interpretação do teste de solubilidade em tubo. A turvação do meio indica a positividade.

eletroforese em pH alcalino. O teste é indicado para ser realizado apenas após os seis meses de vida.<sup>76</sup>

Em estudo comparativo dos resultados obtidos pelo uso de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, teste de solubilidade e teste de falcização, Hicks e colaboradores<sup>77</sup> relataram as diferentes sensibilidades e especificidades de cada método citado. Os resultados indicaram uma sensibilidade de 97% com uma especificidade de 99,9% para o teste de falcização; 98,9% e 100% para o teste de solubilidade. A eletroforese apresentou sensibilidade e especificidade de 100% no referido estudo. Os autores também apresentam dados referentes ao percentual de falsos-positivos e falsos-negativos de cada técnica. Para o teste de falcização, teste de solubilidade e eletroforese, os percentuais de falsos-negativos foram 3%, 1% e 0% respectivamente. Já os percentuais de falsos-positivos foram 0,07% para o teste de falcização e 0% para os demais testes. O teste de solubilidade foi avaliado por Surve e colaboradores<sup>78</sup> como teste de triagem para a doença falciforme. A sensibi-

lidade da técnica encontrada foi de 93,8%, e especificidade de 100%, com valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 96,7%, demonstrando ser um teste confiável para a detecção dos estados homozigotos e heterozigotos da doença falciforme.

Entre as causas de falsos-positivos, podem-se destacar as hemoglobinas instáveis em pacientes esplenectomizados e o mieloma múltiplo, enquanto casos falsos-negativos podem ser observados em pacientes com a anemia intensa, pelo pequeno volume de sangue, e em indivíduos portadores AS que também são portadores de talassemia  $\alpha$ .<sup>73</sup>

O teste de falcização utiliza uma substância redutora, o metabissulfito, para a desoxigenação do eritrócito, que, contendo a HbS, adquire o formato de foice. É um teste de custo muito baixo e com alta sensibilidade e especificidade, porém depende integralmente de uma prática cuidadosa para a confecção da lâmina a ser analisada e de experiência do observador para emitir o resultado. Além disto, ao contrário do teste de solubilidade, o resultado não é imediato, sendo necessário o aguardo de no mínimo uma hora.<sup>79</sup> A **Tabela 7.6** compara alguns aspectos técnicos entre o teste de solubilidade para a HbS e o teste de falcização.

TABELA 7.6 Comparação entre o teste de solubilidade e o teste de falcização		
	TESTE DE SOLUBILIDADE	TESTE DE FALCIZAÇÃO
Experiência do analisador	Não é necessária	É necessária e imprescindível
Resultado	Imediato	Em até 24 horas
Execução da técnica	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Fácil, não requer experiência</li><li>▪ Possibilidade de execução de vários testes ao mesmo tempo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Necessita de cautela e prática.</li><li>▪ É necessário que cada teste seja realizado separadamente</li></ul>

### Quantificação da fração A<sub>2</sub>

A metodologia mais precisa e confiável para a dosagem da fração A<sub>2</sub> é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), já que a focalização isoelétrica (FI) não apresenta bom desempenho. A eletroforese com eluição é aceitável em laboratórios que realizam a técnica regularmente, devido à complexidade técnica para a sua realização. Índices hematimétricos típicos com fração A<sub>2</sub> aumentada dosada por eluição é metodologia confiável para o diagnóstico de  $\beta$ -talassemia.<sup>76</sup>



### Determinação da concentração de hemoglobina fetal

A hemoglobina fetal eleva-se na anemia falciforme, nas talassemias maior e intermediária, na persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) e nas talassemias  $\delta\beta$ . Pode ser estimada laboratorialmente por vários métodos, mas os mais utilizados são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a desnaturação alcalina. A HPLC pode subestimar a quantidade de hemoglobina fetal na presença de hemoglobinas instáveis, além de sofrer influência na sua eluição com a hemoglobina glicada (HbA1c).

Com custo menor, o teste de desnaturação alcalina para a determinação da hemoglobina fetal é metodologia utilizada na rotina laboratorial há muitos anos. Em concentrações abaixo de 15%, essa técnica apresenta boa confiabilidade, porém concentrações elevadas podem ser subestimadas por essa técnica.<sup>76</sup> Baseando-se na desnaturação alcalina, dois métodos são propostos: o método de Singer, para altas concentrações de HbF, e o método de Betke, para baixas concentrações de HbF. Aproximadamente metade dos indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor apresenta concentrações de HbF entre 2 a 5%; nos casos de  $\beta$ -talassemia maior, os níveis podem variar entre 20 a 90%. Em pacientes sem nenhuma alteração hematológica evidente, concentrações de HbF acima de 10% são sugestivas de persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF).<sup>75</sup>

### Determinação da concentração de meta-hemoglobina

A avaliação da meta-hemoglobina é um importante marcador biológico de processos oxidativos, porém sua determinação é pouco solicitada na rotina laboratorial. Este fato pode ser explicado pelo desconhecimento do quadro hematológico de meta-hemoglobinemia como, também, por fatores técnicos.<sup>80</sup> A técnica proposta por Evelyn & Malloy, em 1938,<sup>81</sup> utiliza compostos químicos altamente tóxicos, o que desencoraja sua utilização. Os métodos enzimáticos possuem um custo elevado, o que dificulta a realização da dosagem na rotina laboratorial.

Com a publicação, por Naoum,<sup>80</sup> de um teste quantitativo de meta-hemoglobina por meio da absorção espectrofotométrica e sem a utilização de compostos tóxicos, abriu-se uma nova perspectiva para o diagnóstico da meta-hemoglobinemia. Neste trabalho, foram estabelecidos os valores de

referência para uma população normal adulta, que variou de 1,9 a 3,8%. A técnica proposta para a dosagem de meta-hemoglobina, em valores percentuais, fundamenta-se na avaliação da solução previamente estabilizada em tampão fosfato 60 mol/L, em dois comprimentos de onda específicos para meta-hemoglobina (630 nm) e oxi-hemoglobina (540 nm), após hemólise com saponina a 1%. Rechetzki e colaboradores<sup>82</sup> utilizando a técnica proposta por Naoum, encontraram elevação dos valores de meta-hemoglobina em crianças, quando comparados à concentração de meta-hemoglobina em adultos (3,41 a 6,44%).

### Pesquisa de corpos de Heinz e precipitados de hemoglobina H

Os corpos de Heinz são partículas de polipeptídeos oriundos da desnaturação de hemoglobinas que se fixam à membrana dos eritrócitos. Em portadores de hemoglobinas instáveis e em indivíduos esplenectomizados, esses corpúsculos são geralmente grandes e grosseiros, o que os diferencia dos reticulócitos. Os agregados de hemoglobina H são tetrâmeros de cadeias  $\beta$  ( $\beta_4$ ) presentes em pacientes com  $\alpha$ -talassemia. A pesquisa utiliza corantes supravitais, como o azul de cresil brilhante ou violeta de metila, que são incubados com o sangue por 30 minutos a 37°C.

### Teste de precipitação pelo isopropanol para hemoglobinas instáveis

A estabilidade da hemoglobina ocorre pela interação entre o grupamento heme e as cadeias globínicas. Quando submetidas ao calor ou dissolvidas em tampão apropriado, as hemoglobinas instáveis podem ser detectadas. A hemoglobina normal mantém límpido um tampão com isopropanol durante 30 a 40 minutos, enquanto hemoglobinas instáveis precipitam em aproximadamente 10 a 20 minutos. Esse teste é específico para a detecção de hemoglobinas instáveis.

## ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS – HEMOCROMATOSE E PORFIRIAS

A hemocromatose e as porfirias foram incluídas na sequência das anemias microcíticas e hipocrômicas porque a primeira tem como defeito básico um aumento na absorção do ferro, e a segunda está relacionada com a síntese do heme, mas o defeito está no acúmulo de metabólitos da via do heme por defeito das enzimas que participam dessa via metabólica.



## Hemocromatose

A sobrecarga de ferro pode ocorrer em indivíduos submetidos a repetidas transfusões sanguíneas,<sup>33</sup> e um exemplo desta situação são os talassêmicos (talassemia maior) que são dependentes de transfusão. Os eritrócitos transfundidos, quando se tornarem senescentes, serão retirados da circulação. Após a hemólise, a hemoglobina é degradada, e todos os seus componentes são reaproveitados ou excretados, com exceção do ferro, pois o organismo humano não possui uma via excretora de ferro.<sup>4</sup> Outra causa de sobrecarga de ferro é absorção excessiva a partir da dieta, quadro que caracteriza a hemocromatose,<sup>33</sup> uma doença genética de herança autossômica recessiva que, pelo acúmulo de ferro, causa danos irreversíveis em órgãos como fígado, pâncreas, coração e hipófise.<sup>5</sup> A sobrecarga de ferro também pode ocorrer em dietas em que a oferta de ferro é grande, e a absorção é aumentada.<sup>33</sup>

A causa da hemocromatose são mutações no gene *HFE*, que está localizado próximo à região dos genes *HLA*.<sup>33</sup> O gene *HFE* é composto por sete éxons que transcrevem um RNA mensageiro de 4,2 Kb e que se traduz em uma proteína com 343 aminoácidos.<sup>33</sup> A proteína *HFE* expressa-se na porção apical do enterócito (duodeno) e nas células do sistema mononuclear fagocitário.<sup>7</sup> Em um indivíduo normal, com estoques de ferro adequados, a proteína *HFE* liga-se à  $\beta_2$  microglobulina. Deste modo, a afinidade da transferrina aos seus receptores diminui, o que resulta na redução da absorção do ferro.<sup>33</sup> Na deficiência de ferro, a síntese da proteína *HFE* está diminuída, assim como a ligação à  $\beta_2$  microglobulina; a afinidade da transferrina aos seus receptores aumenta, e, com isto, aumenta a absorção do ferro. Estão descritas mais de 30 mutações no gene *HFE*. A mutação mais comum em indivíduos com hemocromatose é a troca de um nucleotídeo na posição 845, troca de guanina por adenina: 845G→A no éxon 4, o que acarreta a troca da cisteína por tirosina na posição 282 da proteína. Esta mutação é chamada de *Cysteine282Tyrosine* ou *Cys282Tyr* ou *C282Y*.<sup>8</sup> A segunda mutação mais comum é a troca de um nucleotídeo na posição 187, na qual ocorre a troca de uma citosina por guanina (187C→G) no éxon 2. Na proteína, ocorre a troca da histidina por asparato na posição 63, e a mutação é chamada de *H63D*.<sup>68</sup> Algumas das mutações descritas estão associadas com alta sobrecarga de ferro, como *C282Y*, *R330M*, *IVS3(+1)G→T*, *E168X*, *C282S* e

*R74X*;<sup>8</sup> outras têm um efeito discreto ou moderado na sobrecarga de ferro, como *H63D*, *S65C*, *G93R*, *I105T* e *E168Q*.<sup>33</sup> Algumas mutações identificadas não estão correlacionadas com sobrecarga de ferro, como *V53M*, *V59M*, *Q127H* e *E277K*.<sup>33</sup> As mutações que causam o quadro clínico de hemocromatose fazem com que haja perda do mecanismo regulatório de absorção do ferro, que passa a ser absorvido em quantidades aumentadas. A absorção aumentada durante muito tempo determina que os estoques de ferro fiquem plenos, e o ferro começa a aparecer na circulação na forma livre com consequente depósito em órgãos como fígado, pâncreas, coração, baço e hipófise.<sup>5</sup> A lesão celular causada pelo ferro deve-se ao fato de ele catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio e ânion superóxido em radicais livres, como o radical hidroxil. Este radical (hidroxil) tem uma ação lesiva direta sobre o DNA, ácido hialurônico, e faz a peroxidação dos lipídeos de membrana e lisossomos, levando à lise celular.<sup>4</sup>

Existem cinco subtipos de hemocromatose descritos. A hemocromatose do tipo 1, ou hemocromatose hereditária, é causada por mutação no gene *HFE* e é o subtipo mais comum em termos de prevalência e sintomas clínicos.<sup>4</sup> A hemocromatose subtipo 2, ou juvenil, é rara e de herança autossômica recessiva e apresenta um aumento progressivo de ferro na segunda e terceira décadas de vida.<sup>4</sup> A hemocromatose subtipo 3, também de herança autossômica recessiva, foi descrita no sul da Itália.<sup>4</sup> As mutações no gene *HFE* são mais comuns em populações caucasóides, nas quais uma a cada 10 pessoas são heterozigotas e de 0,3 a 0,5% são homozigotas para a mutação.<sup>4</sup> A prevalência mundial da hemocromatose hereditária na faixa etária entre 18 a 70 anos está entre 1,5 a 3 indivíduos para cada 1.000.<sup>4</sup> A homozigose para a mutação *C282Y* está presente em 60 a 100% dos pacientes caucasóides clinicamente diagnosticados com hemocromatose hereditária.<sup>4</sup> A mutação *H63D* é mais comum, mas só ocorre o acúmulo progressivo de ferro quando ela está em heterozigose com a mutação *C282Y* (*C282Y/H63D*), o que explica a baixa incidência de relatos de acúmulo progressivo de ferro somente com a mutação *H63D*.<sup>4</sup> A doença ocorre na razão de 3:1 entre homens e mulheres que, devido à perda fisiológica de ferro durante a menstruação, gestação e lactação, apresentam manifestações mais sutis e tardias.<sup>4</sup> Geralmente, a doença se manifesta após os 40 anos em homens e após os 50 anos em mulheres; difícil-



mente os sintomas clínicos se manifestam antes dos 20 anos.<sup>4</sup>

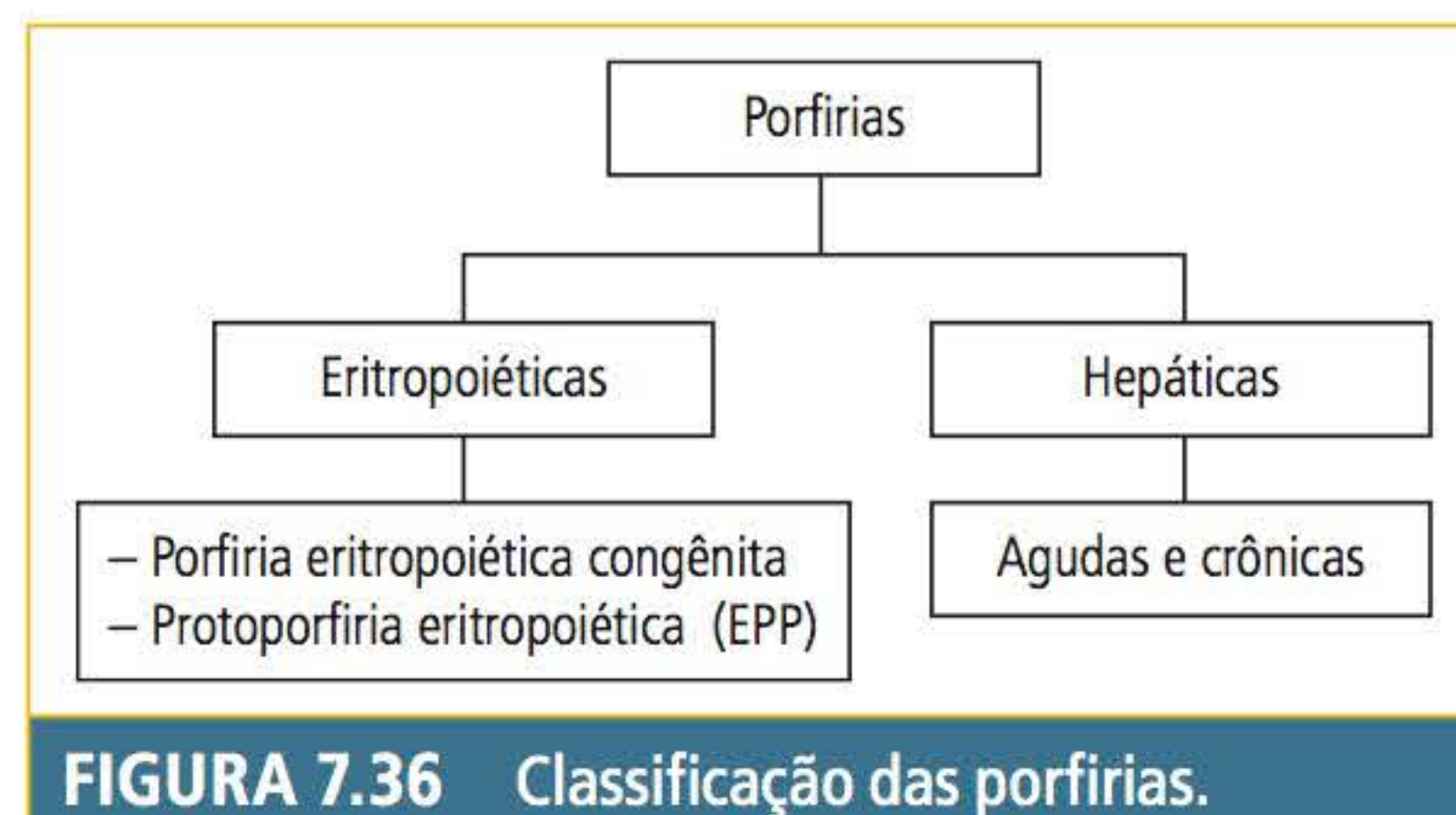
Os principais sintomas clínicos incluem hepatomegalia, pigmentação da pele (particularmente nas áreas expostas ao sol), diabetes melito e disfunção cardíaca.<sup>4</sup> A tríade clássica de cirrose, diabetes melito e pigmentação cutânea ocorre mais tardiamente e quando o conteúdo de ferro corporal está em torno de 20 gramas, cinco vezes acima do normal.<sup>4</sup> O fígado geralmente é o primeiro órgão a ser afetado com hepatomegalia, presente em mais de 95% dos pacientes sintomáticos.<sup>4</sup>

O hemograma não é elucidativo na hemocromatose; o diagnóstico laboratorial deve ser feito pela dosagem do ferro sérico, capacidade de transporte, índice de saturação e dosagem da ferritina. O ferro sérico está elevado, a capacidade de transporte está diminuída, e o índice de saturação está aumentado. O índice de saturação da transferrina constitui-se no teste mais sensível para a maioria das formas de hemocromatose; um índice de saturação persistentemente elevado e maior que 60% para homens e 50% para mulheres é indicativo de hemocromatose.<sup>4</sup> A dosagem da ferritina deve ser interpretada com cuidado porque se encontra elevada em outras situações, como em lesões tissulares (traumas, queimaduras) e em doenças neoplásicas (neuroblastoma, tumores de células germinativas, histiocitoses malignas).<sup>4</sup> Aumento nos níveis plasmáticos de ferritina acima de 300 µg/L para homens e 200 µg/L para mulheres é indicativo de acúmulo progressivo de ferro.<sup>4</sup> Determinações combinadas da porcentagem de saturação do ferro e a dosagem da ferritina se constituem em uma prova de triagem para a hemocromatose. Se qualquer um dos testes estiver anormal, pode-se fazer uma biópsia hepática para avaliar o estoque de ferro e estimar a quantidade total de ferro.<sup>4</sup> Em pacientes que apresentam sintomas clínicos ou exames laboratoriais indicativos de acúmulo de ferro, deve ser feita a pesquisa das duas principais mutações para o gene *HFE* (C282Y e H63D) por biologia molecular.<sup>4</sup> Após a localização do probando, a família deve ser pesquisada sobre o acúmulo de ferro e a presença das duas principais mutações do gene *HFE*.

## Porfirias

As porfirias são doenças metabólicas hereditárias que consistem na deficiência das enzimas que participam da via metabólica da síntese do heme. A consequência dessa deficiência é o acúmulo de me-

tabólitos intermediários (porfirinogênio, porfirina e seus precursores, como o ácido-5-δ-aminolevulínico e o porfobilinogênio), os quais, em excesso, acumulam-se nos tecidos, ocasionando sintomas neurológicos e/ou fotosensibilidade cutânea.<sup>57</sup> A **Figura 7.36** mostra a classificação das porfirias.



**FIGURA 7.36** Classificação das porfirias.

As porfirias agudas são representadas pelas seguintes patologias: porfiria por deficiência da ALA desidratase, porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditária (HCP) e porfiria variegata (VP). As crônicas são representadas pela porfiria cutânea tarda (PCT). A porfiria hepatoeritropoiética (HEP) é uma forma intermediária de expressão do defeito hepático e hematológico.<sup>35</sup> Oito enzimas estão envolvidas na biossíntese do heme, a ALA sintetase, a ALA desidratase, a porfobilinogênio desaminase, a uroporfirinogênio III sintetase, a uroporfirinogênio III descarboxilase, a coproporfirinogênio III oxidase, a protoporfirinogênio III oxidase e a ferroquelatase. Com exceção da primeira enzima (ALA sintetase), todas as demais estão associadas com um defeito enzimático.<sup>57</sup>

A porfiria eritropoiética congênita (CEP) ocorre por deficiência da enzima uroporfirinogênio III sintetase, causando um acúmulo do hidroximetilbilano, também chamado de porfirina do tipo I. Os sintomas manifestam-se na infância. Já foram descritos 18 tipos de mutações no gene da uroporfirinogênio III sintetase, as quais incluem deleções, inserções, rearranjos, anormalidades no *splicing* e mutações *missense* e *nonsense*.<sup>57</sup> É uma doença de herança autossômica recessiva cujo principal órgão de manifestação é a medula óssea. A maioria dos eritroblastos mostra fluorescência, principalmente no núcleo; as porfirinas acumuladas na medula óssea espalham-se pelo organismo e são a causa dos sintomas clínicos. A hemólise eritrocitária é consequência da fotólise quando os eritrócitos são expostos à luz nos capilares da derme. A principal característica clínica é a fotosensibilidade pronunciada, quando o paciente é



exposto à luz solar, que é acompanhada de hipertricose, alopecia e eritrodontia. O aumento no crescimento de pelos, inclusive na face (hipertricose), a tonalidade avermelhada dos dentes e os caninos afiados conferem a esses pacientes a aparência de vampiros e lobisomens.<sup>31</sup> A anemia hemolítica é acompanhada de esplenomegalia e apresenta policromatofilia, pecilocitose, anisocitose e presença de ponteados basófilos.<sup>57</sup>

A protoporfiria eritropoiética (EPP) é a deficiência da enzima ferroquelatase, o que provoca um acúmulo de protoporfirina IX nos eritrócitos, no plasma e nas fezes. O principal sítio de expressão da doença é a medula óssea, e a herança é autossômica dominante. A doença é característica da infância e tem como principal sinal clínico a fotossensibilidade cutânea. É a forma mais comum de porfiria eritropoiética.<sup>83</sup> As mutações descritas no gene da ferroquelatase incluem mutações *missense*, de *splicing*, deleções intragênicas e provavelmente mutações *nonsense*, sendo que as mais comuns são as mutações de *splicing*.<sup>10</sup> Concentrações elevadas de protoporfirina nos eritrócitos, no plasma e nas fezes são característicos de EPP e pode estar presente uma anemia discreta com microcitose.<sup>84</sup>

A porfiria por deficiência de ALA-desidratase (ADP) é de herança autossômica recessiva, e é a forma mais rara de porfiria. O principal sítio de expressão da doença é o fígado. O diagnóstico é feito pela dosagem de ALA desidratase eritrocitária e pelo acúmulo de ALA na urina, e não estão descritas alterações hematológicas.<sup>57</sup>

A porfiria intermitente aguda (AIP) é uma doença de herança autossômica dominante que apresenta a deficiência da enzima porfobilinogênio desaminase. É a principal porfiria tanto em incidência quanto em gravidade e resulta no acúmulo de porfobilinogênio e excreção de ácido  $\delta$ -aminolevulínico e uroporfirina. Mais de 90 mutações já foram descritas no gene da AIP desde 1989.<sup>85</sup> A partir do tipo de mutação presente, três subtipos de AIP foram descritos: subtipo I (redução intermediária da enzima em torno de 50%),<sup>35</sup> subtipo II (diminuição da atividade enzimática em células não eritroides mas com atividade normal em eritrócitos)<sup>35</sup> e subtipo III (atividade diminuída com presença de enzima estruturalmente anormal).<sup>35</sup> O diagnóstico pode ser feito pela dosagem da enzima nos eritrócitos (atividade em torno de 50% do normal faz o diagnóstico) e dosagem da enzima em fibroblastos ou linfócitos.<sup>86</sup> Não apresenta alterações hematológicas.

A coproporfiria hereditária (HCP) é de herança autossômica dominante, e a enzima defeituosa é a coproporfirinogênio III oxidase (CPO). Os principais sintomas da HCP são dor abdominal, vômito, constipação e neuropatia, e a fotossensibilidade cutânea está presente em 30% dos pacientes. O diagnóstico é feito pelos sintomas clínicos e pela presença de coproporfirinogênio III na urina. Não apresenta alterações hematológicas.<sup>57</sup>

A porfiria variegata (VP) é um defeito da enzima protoporfirinogênio III oxidase e é de herança autossômica dominante. O diagnóstico é feito pela fluorescência plasmática da porfirina.<sup>57</sup> Não apresenta alterações hematológicas.

A porfiria cutânea tarda (PCT) é um defeito da enzima uroporfirinogênio III descarboxilase, é forma mais comum de porfiria e pode ser transmitida como herança genética ou ser adquirida. Três tipos de PCT estão descritos: tipos I, II e III. O tipo I não apresenta história familiar, tem nível enzimático normal no eritrócito e diminuído no fígado, o tipo II apresenta 50% de atividade enzimática em todos os tecidos, e o tipo III tem as mesmas características do tipo I. A diferença entre as duas PCT é que na do tipo I os sintomas se manifestam em presença de álcool, estrogênios, drogas, sobrecarga de ferro e em associação com outras doenças, e a do tipo II tem um componente genético e já foi descrita em mais de um membro de uma mesma família. O diagnóstico é feito pela fluorescência, detectada por luz ultravioleta, das porfirinas na urina e pela quantificação das uroporfirinas. Não apresenta alterações hematológicas.<sup>57</sup>

Porfiria hepatoeritropoiética (HEP) manifesta-se na forma homozigota e é uma deficiência da enzima uroporfirinogênio III descarboxilase.<sup>35</sup> O diagnóstico inclui fotossensibilidade grave e elevado nível fecal e urinário de isocoproporfirina e de protoporfirina eritrocitária ligada ao zinco.<sup>35</sup> Apresenta anemia hemolítica, esplenomegalia e hiperplasia eritroide em medula óssea.<sup>35</sup>

## ANEMIAS MACROCÍTICAS

O diagnóstico diferencial das anemias macrocíticas se dá principalmente entre (1) aquelas cuja causa é uma síntese prejudicada de DNA na medula óssea que resulta em alterações megaloblásticas nos precursores dos eritrócitos, e (2) aquelas cuja macrocitose origina-se por outros mecanismos. Em geral, as anemias macrocíticas podem



ser divididas em anemias megaloblásticas e em anemias não megaloblásticas.

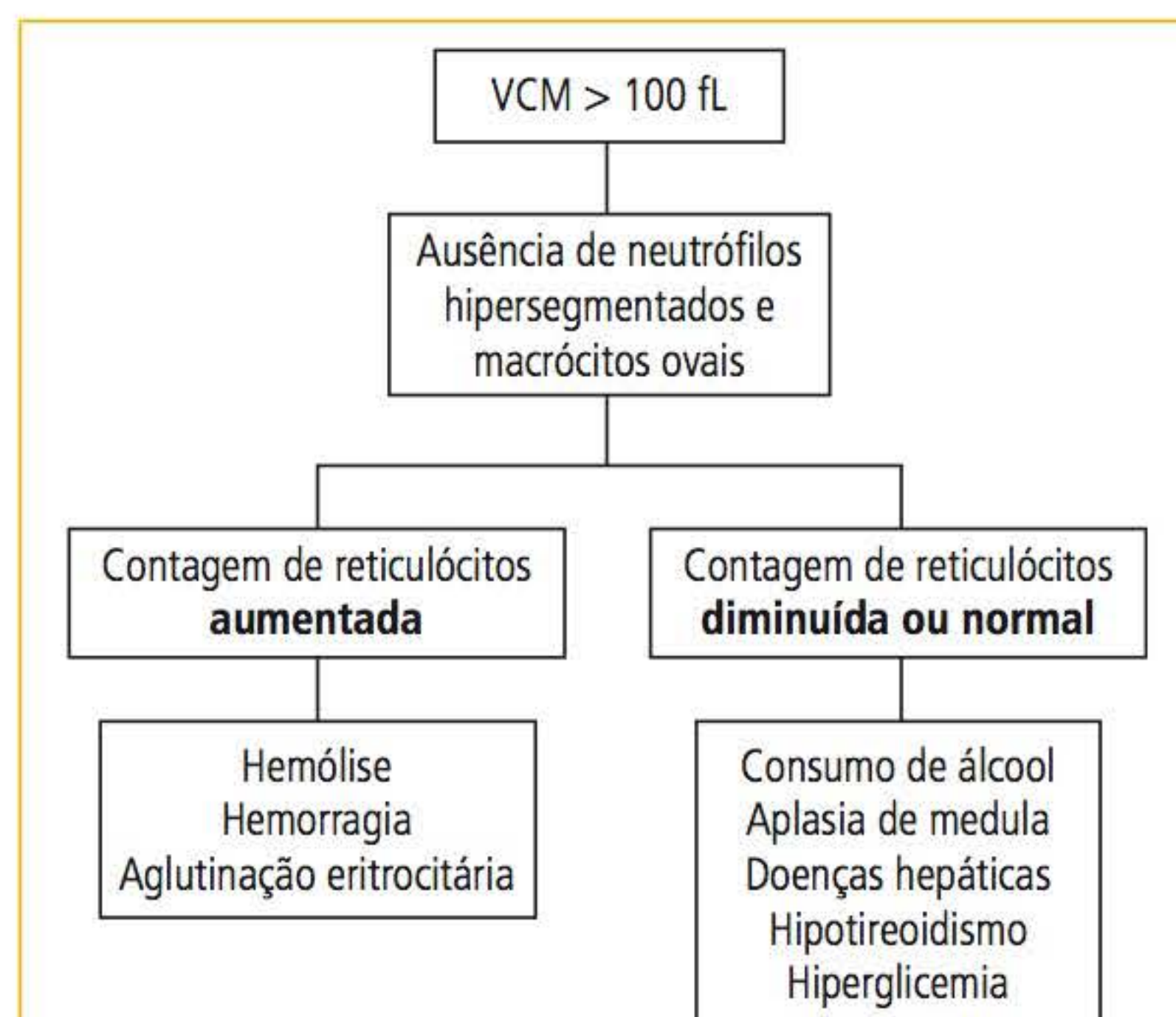
As megaloblásticas são anemias não hemolíticas (classificação fisiológica), enquanto que as anemias não megaloblásticas podem ser hemolíticas ou não hemolíticas. O exame capaz de classificar as anemias não megaloblásticas em hemolíticas e não hemolíticas é a contagem de reticulócitos (valor relativo e absoluto) e do cálculo do índice de produção de reticulócitos (IPR). Nas anemias megaloblásticas, a contagem de reticulócitos (valor relativo e absoluto) está normal ou diminuída, e o índice de produção de reticulócitos é inferior a 2. Nas anemias não megaloblásticas hemolíticas, a contagem de reticulócitos (valor relativo e absoluto) está elevado, e o IPR pode estar entre 2 e 3 ou ainda aumentado (acima de 3), dependendo do quadro hematológico do paciente.<sup>31</sup>

## ANEMIAS MACROCÍTICAS NÃO MEGALOBLÁSTICAS

As anemias macrocíticas não megaloblásticas são anemias em que o VCM situa-se em torno de 100 a 105 fL, enquanto nas anemias megaloblásticas instaladas o VCM está acima de 110 fL. Não se deve esquecer que as anemias megaloblásticas, as quais ocorrem devido à deficiência de ácido fólico e/ou vitamina B<sub>12</sub>, são de instalação lenta e passam de normocíticas e normocrômicas a macrocíticas e, posteriormente, a megaloblásticas. Em uma determinada fase de instalação, elas podem ser confundidas com anemias macrocíticas com contagem de reticulócitos normais ou diminuídos. O exame diferencial nas anemias macrocíticas é a dosagem de vitamina B<sub>12</sub> e folato sérico.

A macrocitose acompanhada de uma atividade aumentada da medula óssea, representada pelo aumento da contagem de reticulócitos, é consequência da presença do próprio reticulócito na corrente circulatória, que é 25% maior que o eritrócito, e também pelo fato de o aumento da atividade da medula óssea determinar que ocorra uma liberação prematura de reticulócitos para o sangue periférico.<sup>32</sup> Esta segunda situação leva ao aumento do VCM, o que caracteriza um quadro de pseudomacrocitose, porque o aumento do VCM é devido ao reticulócito prematuro liberado pela medula óssea e não ao volume do eritrócito. A produção da eritropoietina nessa situação também está aumentada. A pseudomacrocitose (macrocitose acompanhada de atividade de medula

óssea) fala a favor de anemia hemolítica em crise, que pode ocorrer nas crises de hemólise da esferocitose hereditária e da deficiência de G-6-PD. A **Figura 7.37** faz um resumo das características laboratoriais das anemias não megaloblásticas hemolíticas.



**FIGURA 7.37** Fluxograma para diagnóstico das anemias macrocíticas de caráter não megaloblástico.

Quando a macrocitose não está acompanhada de um aumento da atividade de medula óssea, deve-se pensar em alcoolismo, doença hepática, síndrome mielodisplásica ou em anemias mielotísicas.

Entre 40 a 96% dos alcoolistas crônicos, a maioria dos quais não tem anemia, apresentam macrocitose, que é consequência do efeito do álcool sobre as células da medula óssea;<sup>32</sup> inclusive, o VCM pode ser utilizado na detecção precoce do alcoolismo. Quando o paciente se abstém do álcool, o VCM retorna ao normal em torno de 2 a 4 meses.<sup>31</sup> Na cirrose pelo alcoolismo, 20% dos pacientes apresentam anemia megaloblástica por deficiência de folatos, porque o álcool interfere no metabolismo de folatos, além de que, estes pacientes em geral não têm alimentação rica em folato.

A anemia da doença hepática é multifatorial e pode ser devida à hipervolemia, resposta inadequada da medula óssea e estar associada à hemólise grave. Nas hepatites agudas, não há macrocitose.<sup>15</sup> A anemia geralmente é de discreta a moderada. Na cirrose hepática, o nível de hemoglobina fica em torno de 12,0 g/dL, e na ausência de sangramentos ou hemólise grave, fica acima de 10,0 g/dL. O VCM raramente excede a 115 fL. A anemia na doença hepática está associada a uma



alteração morfológica específica chamada de *thin macrocytes* (macrócitos finos) ou leptócitos,<sup>15</sup> que são macrócitos que têm a superfície de membrana (área de membrana) aumentada e que na extensão sanguínea são vistos como codócitos.<sup>15</sup> A área da membrana aumenta pela deposição excessiva de colesterol e fosfolípídeo.<sup>32</sup> A anemia hemolítica na doença hepática pode surgir no quadro terminal da doença e com a formação de acantócitos.<sup>15</sup>

As anemias refratárias, também chamadas de anemias mielodisplásicas ou síndromes mielodisplásicas (ver Capítulo 11, Neoplasias hematológicas: leucemias e linfomas), são causadas por um dano na célula-tronco que compromete a sua maturação e são caracterizadas por displasias (desenvolvimento anormal) de precursores celulares da medula óssea.<sup>32</sup>

As anemias mielotísicas são consequências da substituição das células normais da medula óssea por células anormais. Isso ocorre na mielofibrose, nas leucemias, nos linfomas, no mieloma e nas metástases. Uma característica morfológica desse tipo de anemia é a presença de dacriócitos.<sup>32</sup>

A macrocitose que acompanha as anemias refratárias e mielotísicas pode ser explicada pelo fato de os precursores eritrocitários responderem à eritropoietina com o aumento da hemoglobina, mas serem incapazes de aumentar a média da proliferação celular.<sup>32</sup>

ANEMIAS MACROCÍTICAS MEGALOBLÁSTICAS

As anemias megaloblásticas originam-se de deficiências de ácido fólico ou vitamina B<sub>12</sub>, ou de medicamentos que prejudicam a síntese de DNA, como agentes citotóxicos usados na quimioterapia do câncer ou na imunossupressão (ciclofosfamida, azatioprina, hidroxiureia), e fármacos que interferem no metabolismo do ácido fólico (metotrexato, trimetoprim). O resultado é uma maturação nuclear incompleta das células hematopoiéticas na medula óssea com diminuição da divisão nuclear, porém o crescimento citoplasmático, regulado pelo RNA, continua constante. A discrepância entre a maturação do núcleo e o citoplasma é denominada assincronia núcleo-citoplasmática.<sup>69</sup>

Deficiência de vitamina B<sub>12</sub>

A deficiência de vitamina B<sub>12</sub> por ingestão insuficiente é bastante rara, porque ela é largamente encontrada em alimentos de origem animal e tem

uma reserva muito grande no tecido hepático. A reserva de vitamina B<sub>12</sub> é elevada pela sua importância na síntese da bainha de mielina. As principais etiologias que causam deficiência de vitamina B<sub>12</sub> estão descritas no Quadro 7.5.

QUADRO 7.5 Principais etiologias da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>

- Ingesta insuficiente – Indivíduos vegetarianos
- Causa autoimune – Anticorpos contra o fator intrínseco ou contra células parietais
- Deficiência de fator intrínseco – Congênita; gastrite atrófica; gastrectomia total, parcial ou *bypass* gástrico
- Má-absorção – Insuficiência pancreática; síndrome de Zollinger-Ellison; doença celíaca; enterite regional; ressecção do íleo; diverticulose do intestino delgado; infecções parasitárias
- Defeitos do transporte da vitamina B<sub>12</sub> – Deficiência de transcobalamina II

A deficiência dietética da vitamina B<sub>12</sub> tem sido encontrada em vegetarianos que, além de evitarem carne, não se alimentam de leite e ovos. Mesmo assim, a anemia megaloblástica em vegetarianos é rara.<sup>87</sup>

A absorção da vitamina B<sub>12</sub> contida na alimentação inicialmente fixa-se a uma proteína encontrada na saliva, denominada *proteína R*. Nas porções superiores do intestino delgado, ela é liberada por proteases pancreáticas para se ligar ao *fator intrínseco*. Este complexo atravessa o intestino delgado até fixar-se na *transcobalamina II*, um receptor existente nas células da mucosa do íleo (Tabela 7.7).

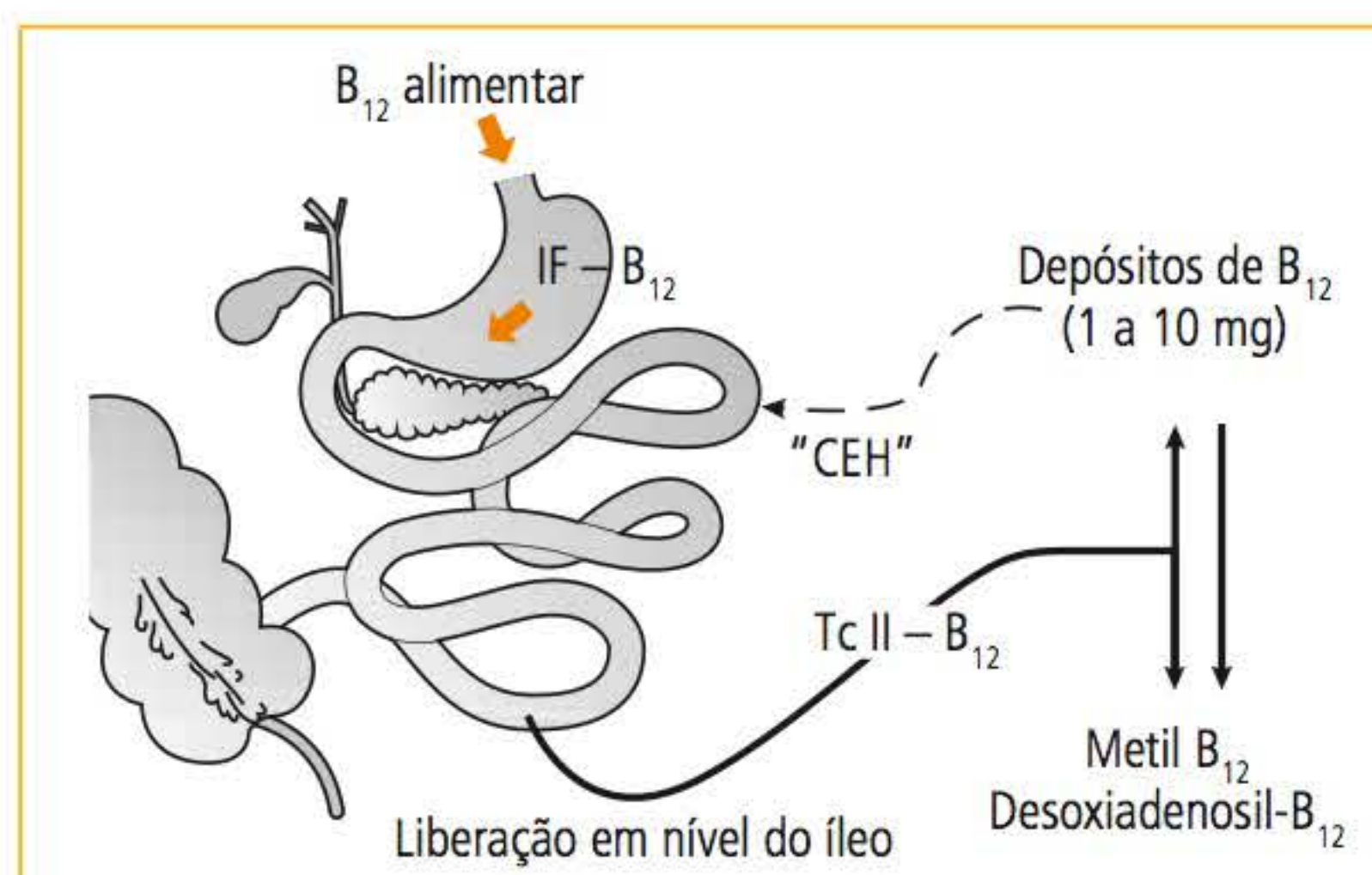
TABELA 7.7 Proteínas que se ligam à vitamina B<sub>12</sub>

PROTEÍNA	FONTE	FUNÇÃO
Fator intrínseco	Células parietais gástricas	Absorção da vitamina B <sub>12</sub> pelo íleo
Transcobalamina II	Praticamente todas as células	Absorção da vitamina B <sub>12</sub> pelas células
Proteína R	Glândulas exócrinas	Não definida

A vitamina B<sub>12</sub> desprende-se do fator intrínseco, sendo então transportada até os tecidos. A vitamina B<sub>12</sub> absorvida pode ser transportada até a medula óssea, enquanto outra porção é armazenada no fígado (Figura 7.38).<sup>88</sup>

A anemia perniciosa é a forma mais comum de deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e ocorre de duas formas: pela falta do fator intrínseco associado à





**FIGURA 7.38** Absorção, transporte e armazenamento da vitamina B<sub>12</sub>.

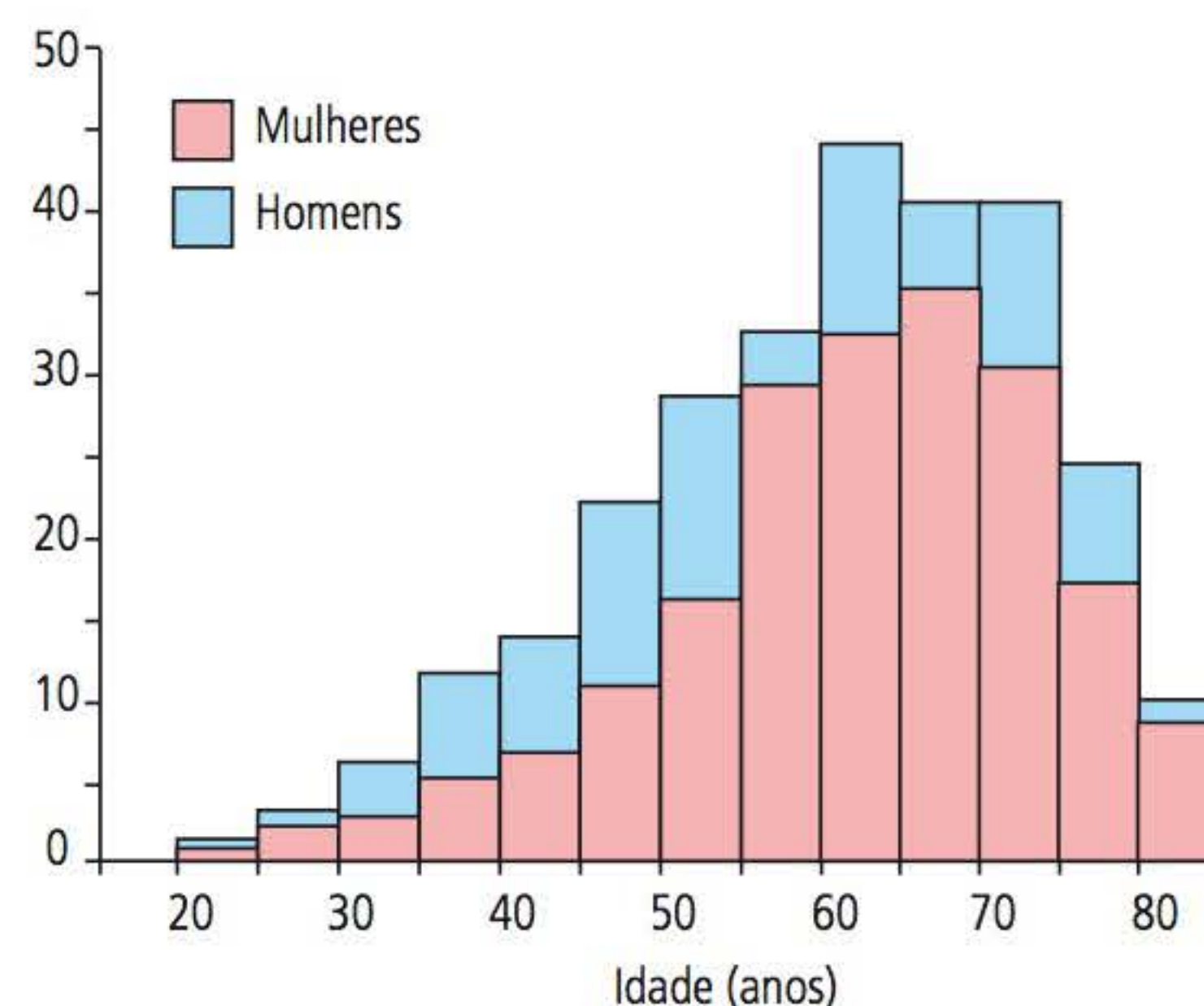
atrofia gástrica e à deficiência de muitas outras secreções gástricas (aquilia gástrica); ou pela falta congênita do fator intrínseco, que é muito rara. Embora as alterações hematológicas e neurológicas sejam manifestações características e mais conhecidas da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, na maioria dos casos, a doença de base é uma gastrite atrófica grave. Nestas condições, ocorre diminuição da maioria das secreções gástricas, entre as quais destaca-se o fator intrínseco, essencial para a absorção da vitamina B<sub>12</sub>. As causas da lesão gástrica são diversas e não totalmente conhecidas. Fatores genéticos, idade avançada e doenças autoimunes parecem predispor o indivíduo a adquirir a deficiência.

A anemia perniciosa é mais frequente em adultos, sendo que a frequência da doença aumenta à medida que a idade avança. A idade média para o desenvolvimento da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> é 60,5 anos.<sup>89</sup> Alguns estudos apontam que as mulheres são mais predispostas a desenvolverem a doença em relação aos homens (**Figura 7.39**).<sup>90,91</sup>

Vários tipos de autoanticorpos, incluindo os anticorpos de células parietais e os anticorpos da tireoide, têm sido detectados em pacientes com anemia perniciosa. Os anticorpos contra o fator intrínseco ocorrem em mais de 50% dos pacientes com essa doença. Além disso, a incidência da anemia perniciosa tem sido associada com outras doenças de caráter autoimune, como hipotireoidismo, hipertireoidismo, vitiligo e o diabetes melito.<sup>87</sup>

Sem o fator intrínseco, a vitamina B<sub>12</sub> é destruída pelo suco gástrico antes de ser absorvida no íleo. Na gastrectomia, a ingestão de agentes corrói a mucosa gástrica, e a produção de um fator intrínseco inerte leva ao mesmo quadro de anemia perniciosa. Em situações de má-absorção intesti-

Número de pacientes



**FIGURA 7.39** Frequência de anemia perniciosa de acordo com o sexo e a idade.

Fonte: Adaptada de Lee.<sup>87</sup>

nal, que pode ser de causa familiar ou induzida por medicamentos, por doença ileal ou por processos infecciosos (o intestino delgado é estéril e mantido deste modo por ação do suco gástrico), a produção de fator intrínseco é normal, mas pelo quadro de síndrome de má-absorção, a vitamina B<sub>12</sub> não é absorvida.<sup>31</sup>

### Achados laboratoriais

Todas as linhagens celulares hematopoiéticas são afetadas. Quando nenhuma outra doença ou complicação está associada à deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, a anemia é macrocítica e normocrômica. O paciente pode apresentar um leve aumento do VCM por anos antes de a anemia se instalar, o que aumenta a importância da avaliação criteriosa de valores de VCM acima da média para a idade do paciente que está sendo avaliado, o que pode auxiliar no diagnóstico precoce da doença. Durante a instalação da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, o VCM tende a ser proporcional ao grau de anemia. Anemia moderada cursa com valores de VCM que variam de 100 a 110 fL, mas, com o agravamento do quadro, o VCM pode chegar a valores superiores a 150 fL. Semelhantemente, o HCM pode chegar a valores acima de 50 pg em situações de anemia extrema.

A macrocitose pode ser mascarada pela coexistência de outras patologias associadas à deficiência de vitamina B<sub>12</sub>. Pacientes com doença de base de caráter crônico (anemias de doenças crônicas), deficiência de ferro e portadores da



$\beta$ -talassemia menor são exemplos de situações em que a macrocitose não estará presente mesmo com a confirmação da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, o que pode dificultar o diagnóstico.<sup>92</sup>

A atividade eritropoiética é estimulada; porém, devido à eritropoiese ineficaz, a contagem de reticulócitos é normal ou baixa. Quando o hematócrito é menor que 20%, eritroblastos com núcleo megaloblástico podem ser vistos no sangue periférico. Os eritrócitos variam muito em sua forma e tamanho, mas são observados muitos eritrócitos grandes de formato oval e, nos casos graves, a presença de ponteados basófilos, corpúsculos de Howell-Jolly e Anel de Cabot são achados comuns.<sup>93</sup>

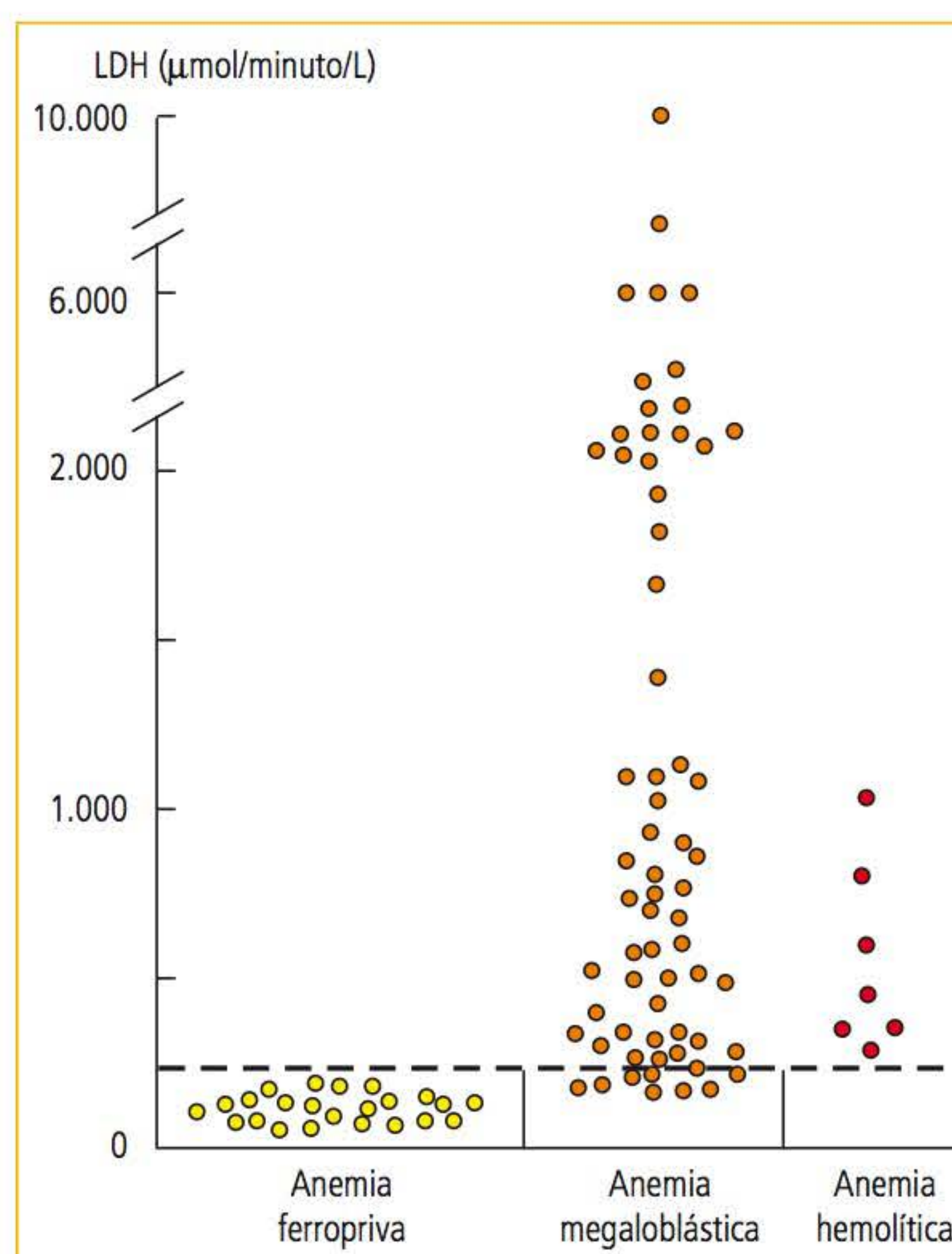
Dois achados são fundamentais e devem ser pesquisados nas macrocitoses: os macro-ovalócitos e a hipersegmentação dos neutrófilos. A hipersegmentação é um dos sinais mais específicos das anemias megaloblásticas. Normalmente, os neutrófilos possuem entre 3 a 5 lobos, sendo que a presença de neutrófilos com mais de seis lobos raramente é observada em condições de normalidade hematopoiética. Na instalação da anemia perniciosa, o achado de neutrófilos hipersegmentados pode ser um dos primeiros sinais da deficiência.<sup>93</sup>

### Lactato desidrogenase

Devido à eritropoiese ineficaz, o ferro sérico é aumentado, a menos que uma deficiência de ferro esteja envolvida de forma concomitante. A atividade da lactato desidrogenase (LDH) está aumentada, sendo que sua elevação é proporcional ao grau da anemia. Tanto a elevação do ferro plasmático quanto a da LDH estão correlacionadas pela destruição dos eritrócitos na medula (eritropoiese ineficaz). A **Figura 7.40** ilustra o comportamento da LDH na anemia megaloblástica em comparação à anemia ferropriva e às anemias hemolíticas.

### Deficiência de folato

A deficiência de folato pode ser causada pela (1) sua pequena quantidade na dieta; (2) pela sua má-absorção; e (3) pelo aumento de sua necessidade no organismo.<sup>93</sup> Os fatores que causam uma deficiência de folato são, em princípio, diferentes dos que produzem a deficiência de vitamina B<sub>12</sub>. O consumo de folato no organismo é maior que o de vitamina B<sub>12</sub>, ou seja, qualquer desequilíbrio no seu metabolismo gera sua deficiência. Ao contrário da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, os estoques de folatos esgotam-se em torno de 2 a 4 meses, en-



**FIGURA 7.40** Comparação entre a atividade enzimática da lactato desidrogenase sérica na anemia ferropriva, na anemia megaloblástica e na anemia hemolítica.

Fonte: Adaptada de Emerson e Wilkinson.<sup>94</sup>

quanto na avitaminose B<sub>12</sub> os estoques podem suportar um aporte insuficiente de vitamina B<sub>12</sub> por anos. É válido lembrar que o ácido fólico é um composto termolábil facilmente destruído em alimentos cozidos; portanto, sua disponibilidade pode ser menor do que a esperada.<sup>2</sup> Situações nas quais o ácido fólico é mal absorvido são raras.

As causas da deficiência de folato são, em sua maioria, relacionadas a dietas pobres e ao aumento do seu consumo. Dietas inadequadas de folatos são comumente vistas em (1) idosos mal alimentados; (2) regimes alimentares extremos sem acompanhamento nutricional; (3) indigentes; e (4) indivíduos que utilizam o álcool de forma crônica.<sup>2</sup>

Na gravidez, as necessidades de ácido fólico aumentam entre 5 a 10 vezes, e, se não houver um aporte, a deficiência certamente se instala. Fatores como dieta deficiente, infecções, anemias hemolíticas ou medicação anticonvulsivante podem agravar o quadro. A deficiência de folato pode ser difícil de ser diagnosticada na gravidez, pois durante este período pode instalar-se uma anemia fisiológica, com concentrações de hemoglobina



baixa (em torno de 10 g/dL) e uma macrocitose com valores de VCM acima de 100 fL. Em muitos casos, a anemia fisiológica só pode ser distinguida da deficiência de folato pela análise da medula óssea.<sup>57,93</sup> Como o uso profilático de ácido fólico durante o período pré-natal tornou-se rotineiro, a incidência da deficiência na gravidez tornou-se achado raro.<sup>87</sup>

A anemia megaloblástica em pacientes alcoolistas é, na maioria dos casos, causada por falta de folatos. A dieta inadequada observada na maioria desses indivíduos é o principal mecanismo de instalação da doença, porém evidências sugerem que o álcool diminui a capacidade de armazenamento de folato no fígado, além de diminuir a sua absorção.<sup>87</sup>

A deficiência de folatos pode ocorrer por má-absorção intestinal induzida por ressecção jejunal, pelo *sprue* tropical (diarreia tropical) e pela sensibilidade ao glúten. A diarreia tropical e a sensibilidade ao glúten causam uma enteropatia que leva à má-absorção simultânea de folato e vitamina B<sub>12</sub>, como resultado de uma atrofia da mucosa intestinal, levando à perda da mucosa intestinal. A diarreia tropical é causada por coliformes, especialmente a *Klebsiella pneumoniae*. Esta doença é comum na Índia, sudeste asiático, Indonésia, Filipinas, África, Porto Rico, Cuba, Haiti, República Dominicana, Venezuela e Colômbia. A sensibilidade ao glúten caracteriza-se por uma reação anormal ao glúten, proteína rica em glutamina, proveniente do trigo e outros grãos e que provoca um quadro de má-absorção intestinal. Pacientes que têm uma taxa de proliferação celular muito elevada podem apresentar uma anemia megaloblástica por deficiência de folato. Um exemplo desta situação é a leucemia mieloide crônica (LMC), na qual, por uma intensa proliferação leucocitária, a reserva de folato se esgota, e a anemia instala-se. Pacientes que têm crises de hemólise frequentes, como na esferocitose hereditária, podem apresentar uma anemia megaloblástica por deficiência de folato.<sup>32</sup>

Vários medicamentos que interferem no metabolismo do folato são causas frequentes de anemia megaloblástica.<sup>2</sup> Já que esses fármacos exercem seus efeitos benéficos por meio de interferência na síntese de DNA, o efeito tóxico pode ser considerado uma extensão de suas ações terapêuticas.<sup>87</sup> Entre esses fármacos, destacam-se agentes citostáticos, como o metotrexato; e anti-parasitários, como a pirimetamina e o trimetro-

pim, que inibe a enzima di-hidro-olatorredutase, responsável pela conversão do di-hidrofolato em tetra-hidrofolato.<sup>2</sup>

As manifestações clínicas da deficiência de ácido fólico assemelham-se às da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, exceto pela doença neurológica, que é uma característica da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>. Clinicamente, a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> se manifesta por alterações neurológicas, como sensações parestésicas em membros inferiores e mãos (neuropatia periférica),<sup>95</sup> dificuldade de locomoção, hipo ou hiper-reflexia e perturbações mentais que podem ir de alucinações até a demência.<sup>95</sup>

### Achados laboratoriais

Tanto na deficiência de vitamina B<sub>12</sub> quanto na de folato, o quadro hematológico (hemograma) é o mesmo, ou seja, não se consegue diferenciar pelo hemograma entre a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e folato. A hemoglobina geralmente está entre 7 e 8,0 g/dL na anemia instalada e pode ter valores mais baixos dependendo da intensidade da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e folato. É uma anemia de instalação lenta, o que induz os pacientes a se adaptarem a níveis extremamente baixos de hemoglobina.<sup>32</sup> O aumento do VCM é proporcional à queda da hemoglobina e à deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e folato. O paciente pode apresentar leucopenia com presença de neutrófilos hipersegmentados e trombocitopenia com presença de plaquetas anormais. O tamanho das plaquetas é bastante variável, mostrado pela elevação do PDW (variação na distribuição do tamanho das plaquetas).<sup>96</sup> A extensão sanguínea mostra, além dos macrócitos, anisocitose e pecilocitose variadas e sinais de alteração da divisão celular como corpúsculos de Howell Jolly e anel de Cabot.

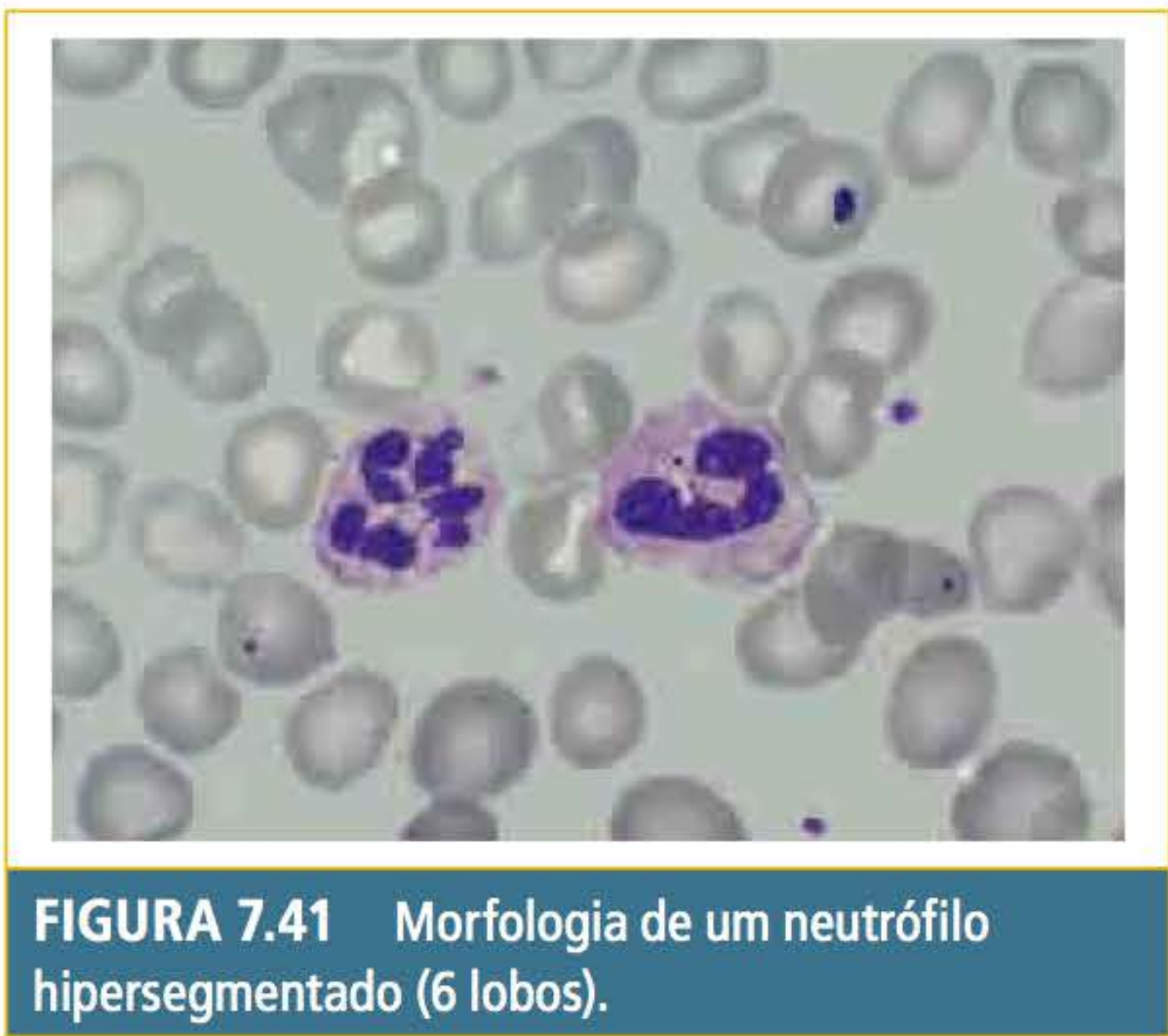
Na medula óssea, os eritroblastos mostram déficit de maturação devido a um assincronismo de maturação entre o núcleo e o citoplasma. Outra característica é que os granulócitos são maiores que os normais, especificamente o metamielócito, que recebe a denominação de metamielócito gigante. Os megacariócitos são muito grandes, mostram deficiência de grânulos citoplasmáticos e podem apresentar os núcleos separados.<sup>57</sup>

### Como contar a hipersegmentação dos neutrófilos?

O procedimento mais simples para detectar a hipersegmentação é examinar 100 neutrófilos consecutivos na extensão sanguínea e registrar o nú-



mero de neutrófilos com seis lobos ou mais (**Figura 7.41**).<sup>87</sup> Valores acima de 3% de neutrófilos hipersegmentados constituem o chamado desvio à direita. Na prática laboratorial, geralmente, usa-se o valor de 5% como um indicador de anemia megaloblástica, sendo considerado um dado eficiente para o diagnóstico da doença. Lindenbaum<sup>97</sup> observou que 98% dos pacientes com anemia megaloblástica tinham pelo menos 2% de neutrófilos hipersegmentados.



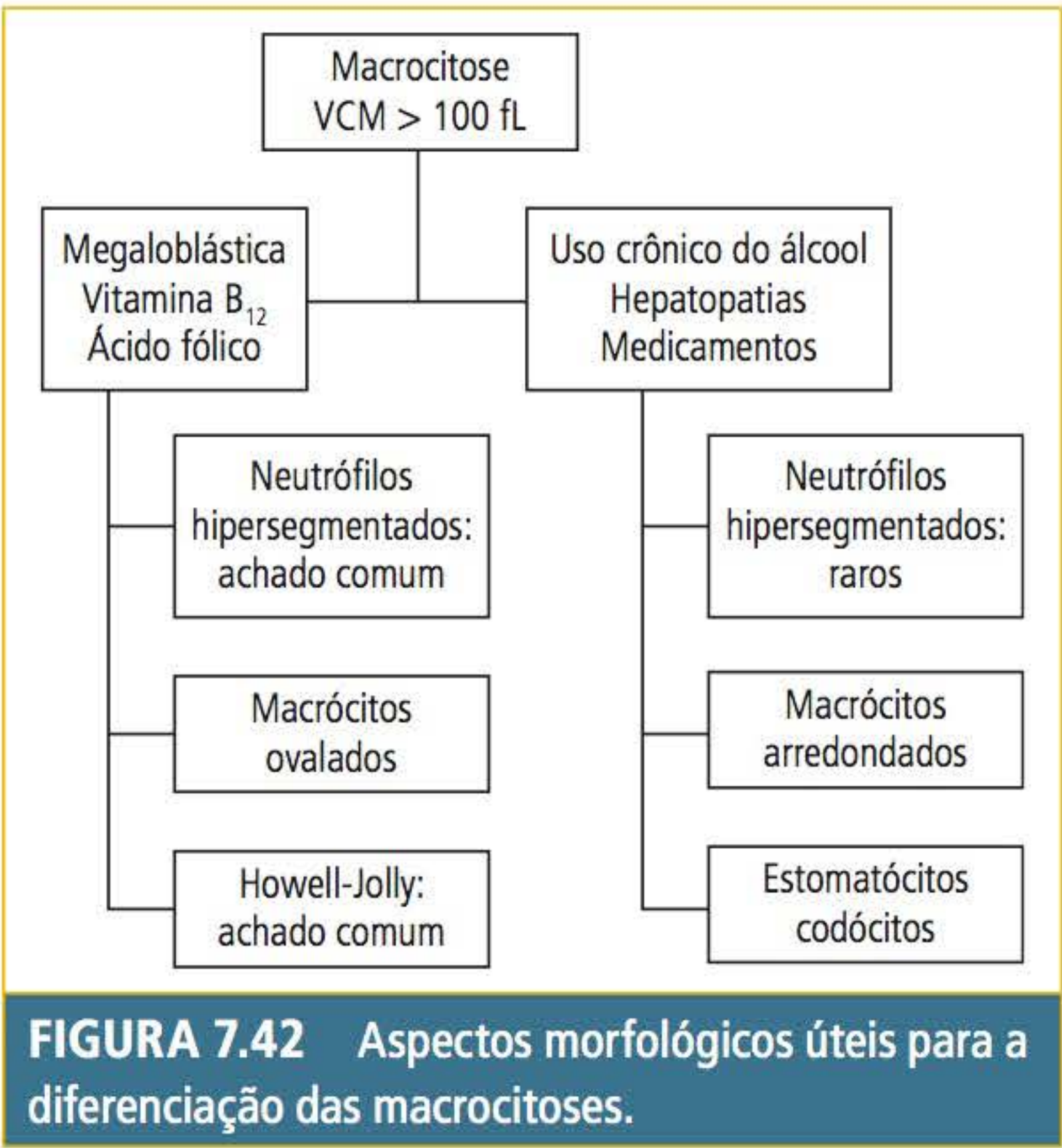
Outras técnicas são descritas para a contagem da hipersegmentação neutrofílica. O índice de Herbert<sup>98</sup> conta o número total de lobos de 100 neutrófilos e divide o valor encontrado por 100. Já o índice de segmentação conta o número de neutrófilos com cinco ou mais lobos e divide pelo número de neutrófilos com quatro lóbulos. Pelo índice de segmentação, valores acima de 16,9 são positivos para a presença de hipersegmentação nos neutrófilos.<sup>6</sup> Na prática laboratorial, essas técnicas são muito trabalhosas e praticamente inviáveis. A pesquisa de hipersegmentados (acima de cinco lobos) em 100 neutrófilos permanece sendo a forma mais adequada para esse achado morfológico.

**Diagnóstico diferencial**

A diferenciação deve ser feita entre a anemia megaloblástica por deficiência de folato ou vitamina B<sub>12</sub> e as outras causas de macrocitose. As causas mais comuns de macrocitose são a ingesta excessiva de álcool, doenças hepáticas e as síndromes mielodisplásicas. Nas macrocitoses causadas pela ingesta excessiva de álcool e nas hepatopatas, os macrócitos não são ovalados, mas arre-

dondados. A anisocitose e a pecilocitose são menos pronunciadas e a presença de codócitos e estomatócitos é achado frequente. Neutrófilos hipersegmentados são raros. Pacientes com insuficiência hepática podem apresentar abundância de acantócitos.

A **Figura 7.42** mostra aspectos morfológicos úteis para a diferenciação entre a anemia megaloblástica e outras causas de macrocitoses.



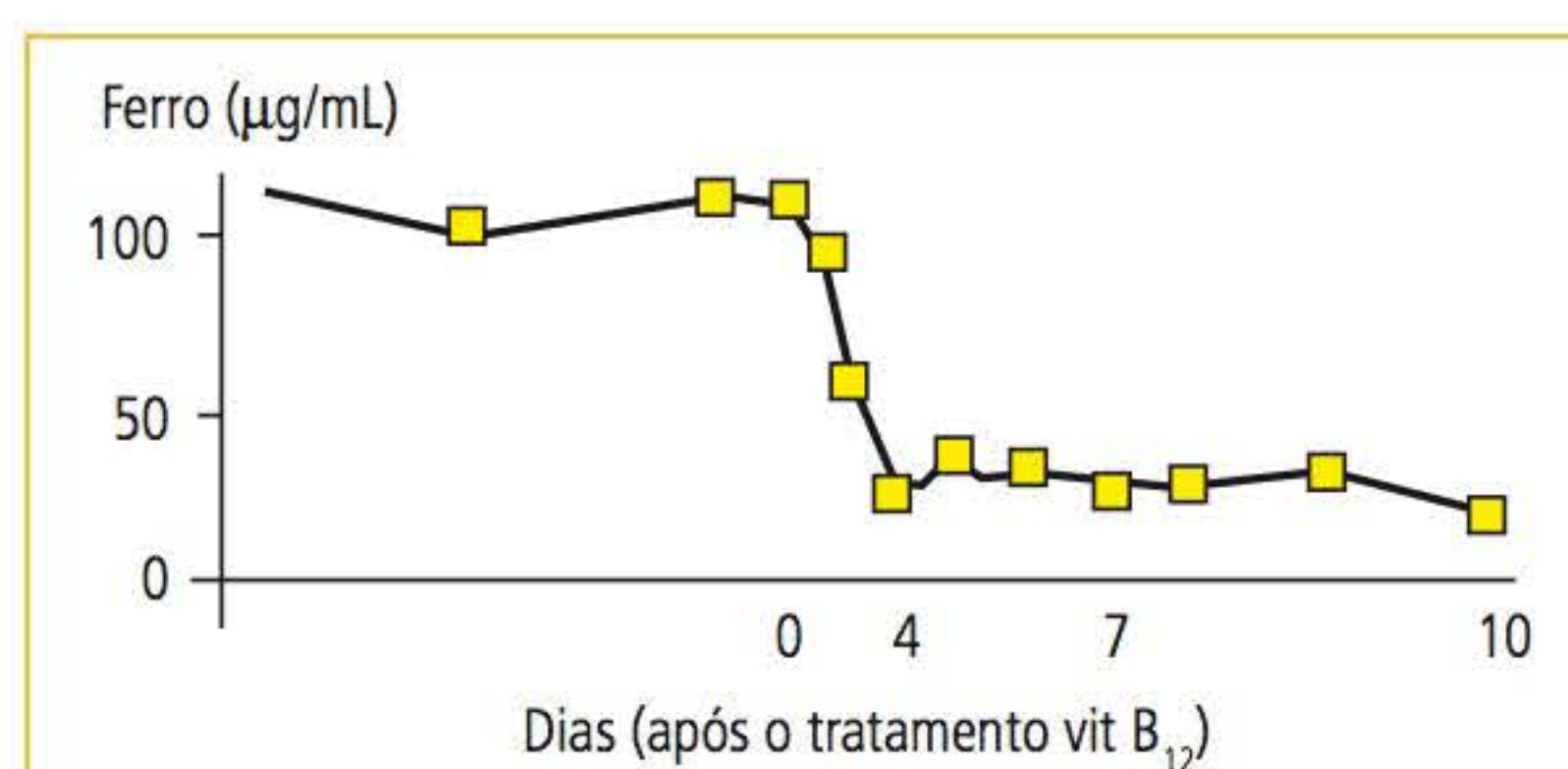
A macrocitose causada pelo metotrexato é indistinguível da causada pela deficiência de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>, mas outros fármacos que interferem na síntese do DNA podem causar macrocitose sem anemia, e a hipersegmentação raramente é observada.<sup>6</sup> A distinção com as anemias macrocíticas não megaloblásticas também pode ser feita pela presença de policromatofilia, reticulocitose e por macrócitos não ovalados, que indicam um estado hemolítico.<sup>87</sup>

A determinação dos níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> e do folato é a única maneira para diferenciar a etiologia das anemias megaloblástica por meio de métodos laboratoriais. O teste de absorção da vitamina B<sub>12</sub> pelo método de Shilling é útil para confirmar essa deficiência. Testes para a detecção de anticorpos contra o fator intrínseco ou contra células parietais são válidos para definir a causa da deficiência de vitamina B<sub>12</sub>. Se a anemia megaloblástica instalada tem relação com doença celíaca, a pesquisa de anticorpos antiendomísio pode ser utilizada.<sup>6</sup>



## Tratamento

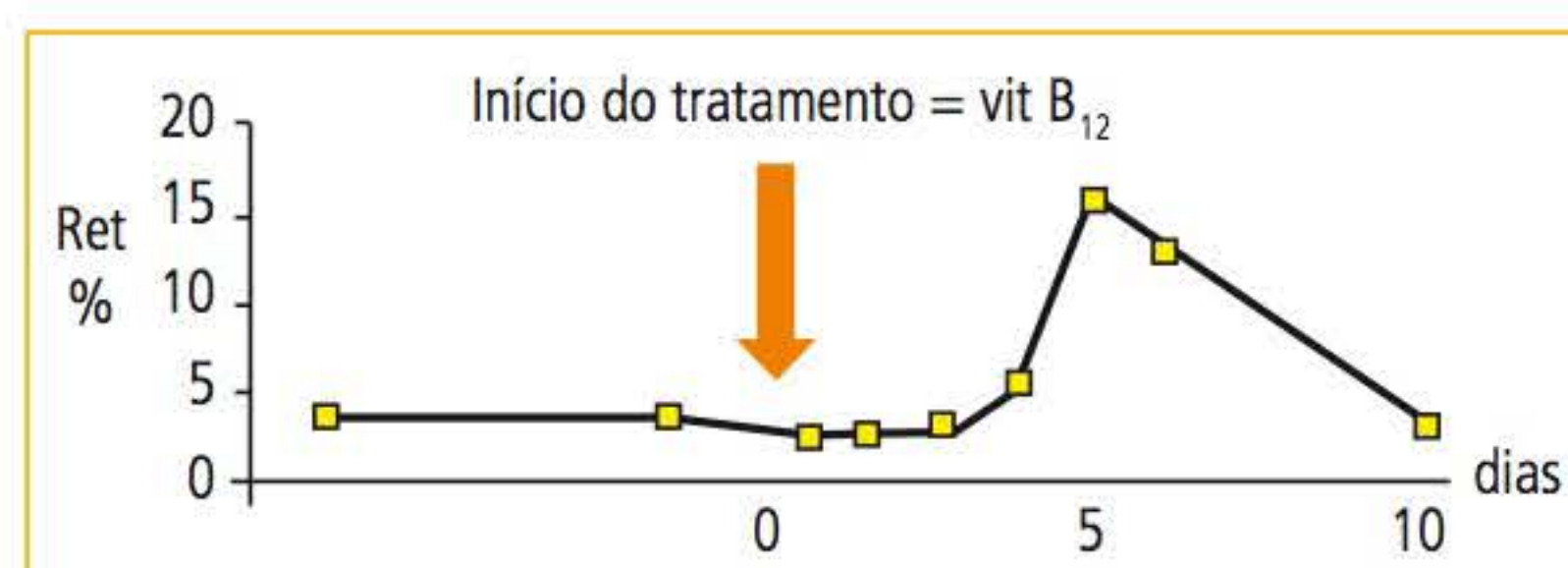
O tratamento das anemias megaloblásticas tem como principal objetivo repor os estoques da vitamina deficiente. Em geral, a correção da deficiência é rapidamente obtida, porém os sintomas clínicos permanecem por mais tempo. Após a reposição de cobalamina, a elevação dos níveis de bilirrubina, ferro e LDH diminuem rapidamente. Dentro de 12 horas, a medula começa a transformar-se de megaloblástica a normoblástica, com a celularidade voltando ao normal entre 2 a 3 dias.<sup>93</sup> A **Figura 7.43** ilustra o comportamento do ferro sérico durante o tratamento da anemia megaloblástica com vitamina B<sub>12</sub>.



**FIGURA 7.43** Efeito do tratamento da anemia megaloblástica com vitamina B<sub>12</sub> sobre as concentrações séricas de ferro.

Fonte: Adaptada de Babior.<sup>93</sup>

O primeiro e mais sutil sinal de resposta hematopoiética ao tratamento da anemia megaloblástica é o aumento na contagem de reticulócitos. Esta elevação inicia-se após 2 a 3 dias de tratamento, e os picos máximos de reticulócitos são obtidos entre o 5º ao 10º dia.<sup>87,93</sup> Eritroblastos podem ser observados nesse período. A **Figura 7.44** ilustra o comportamento da contagem de reticulócitos no tratamento das anemias megaloblásticas com vitamina B<sub>12</sub>.



**FIGURA 7.44** Comportamento da contagem de reticulócitos durante o tratamento da anemia megaloblástica com vitamina B<sub>12</sub>.

Fonte: Adaptada de Babior.<sup>93</sup>

Entre as outras mudanças que ocorrem na resposta hematológica ao tratamento das anemias megaloblásticas, podem-se destacar:

- 1) Normalização da concentração de hemoglobina entre 1 a 2 meses;
- 2) Normalização da contagem de leucócitos e plaquetas, embora a hipersegmentação persista por até 15 dias após o início do tratamento;
- 3) Aumento perceptível do hematócrito entre 5 a 7 dias;
- 4) A eritropoiese ineficaz é revertida em 24 horas.

Como citado anteriormente, a macrocitose característica das anemias megaloblásticas pode ser mascarada por outras alterações como doenças crônicas, anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor. Nestas situações, a deficiência tanto de folato quanto de vitamina B<sub>12</sub> podem cursar com valores de VCM bem menores do que os esperados nas anemias megaloblásticas. A seguir, um exemplo do tratamento de uma anemia megaloblástica por vitamina B<sub>12</sub> em paciente com doença crônica em relação aos parâmetros hematológicos. As **Figuras 7.45 a 7.47** demonstram o comportamento do eritrograma, da contagem de leucócitos e plaquetas durante o tratamento (início, 7 e 14 dias após tratamento).

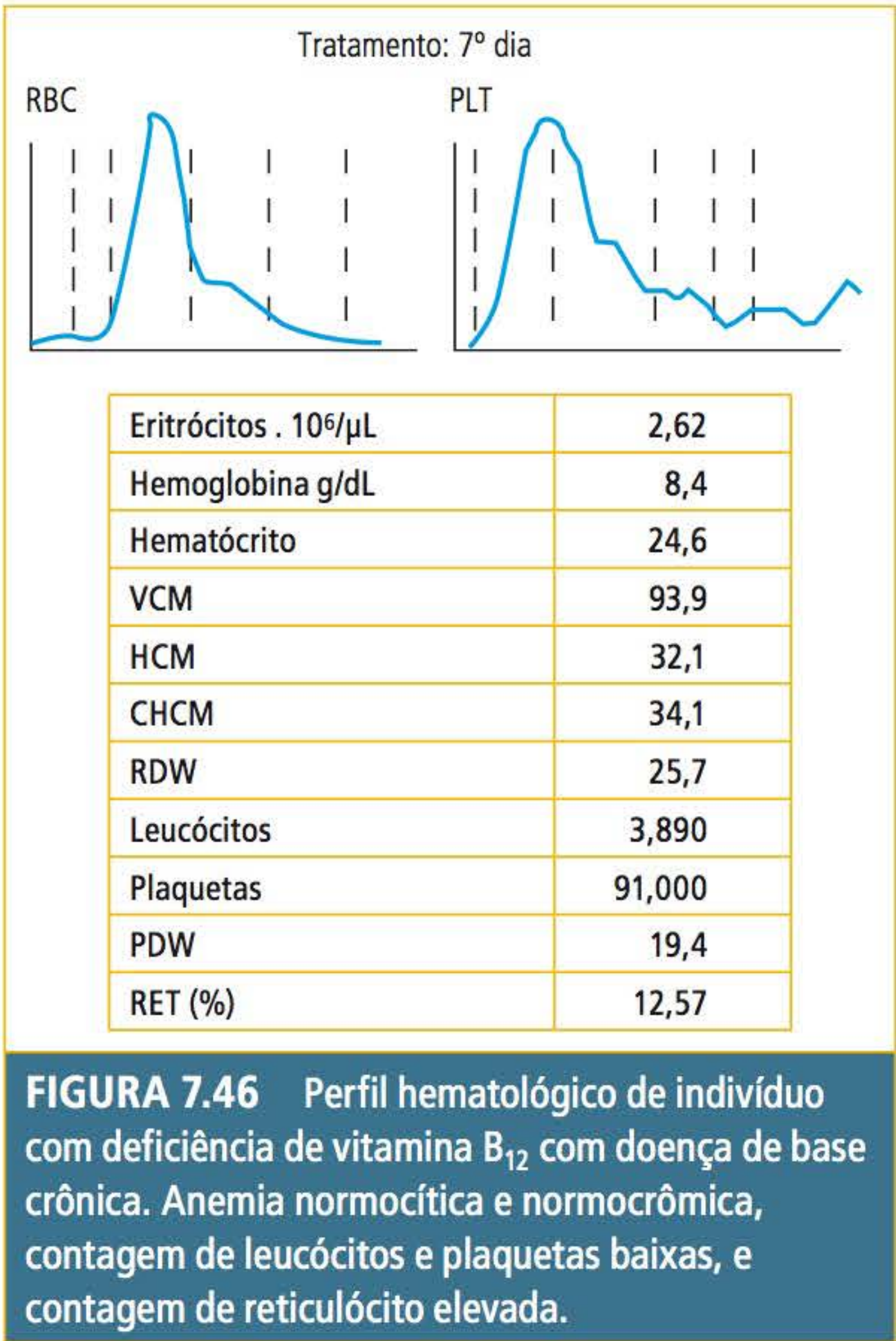
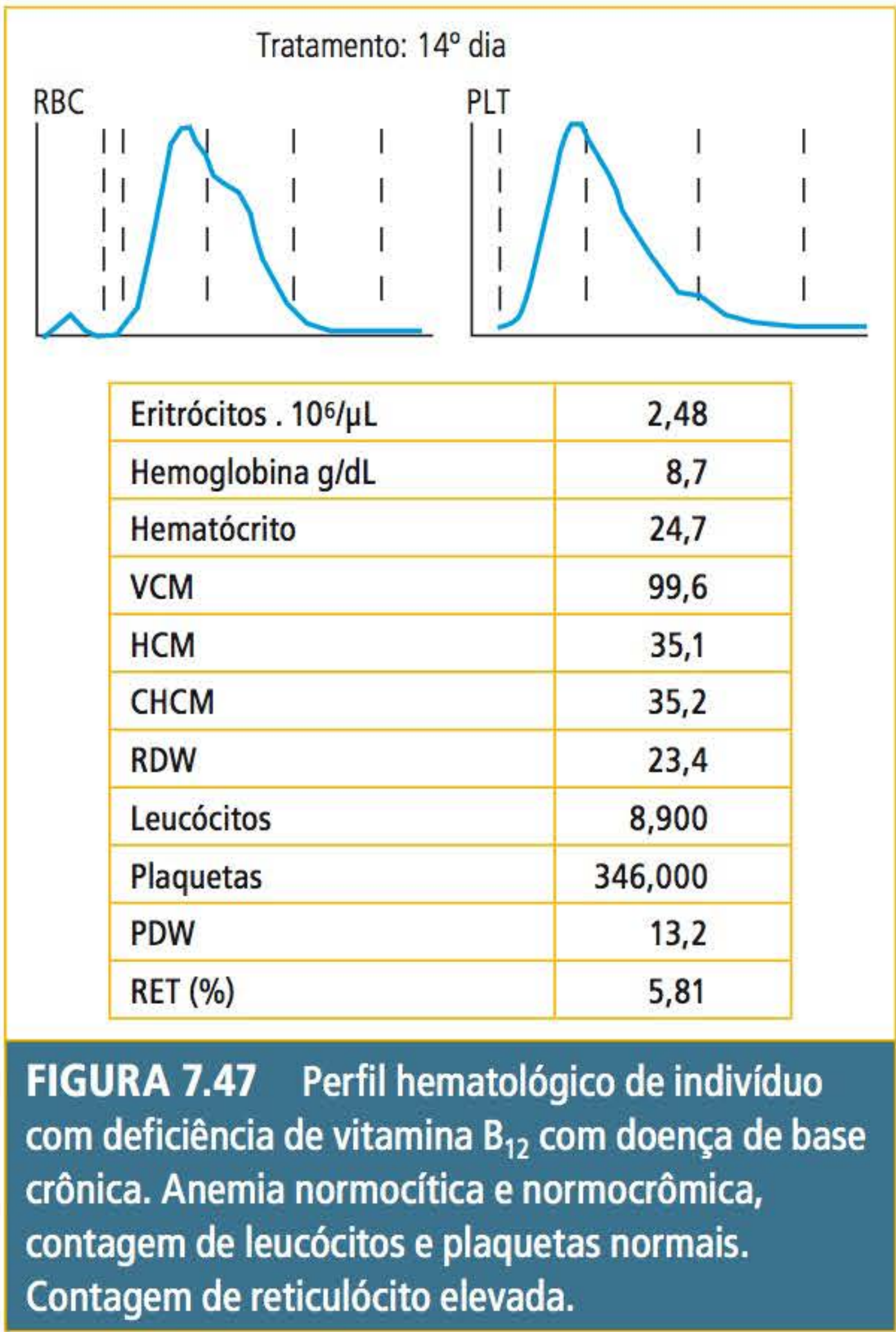
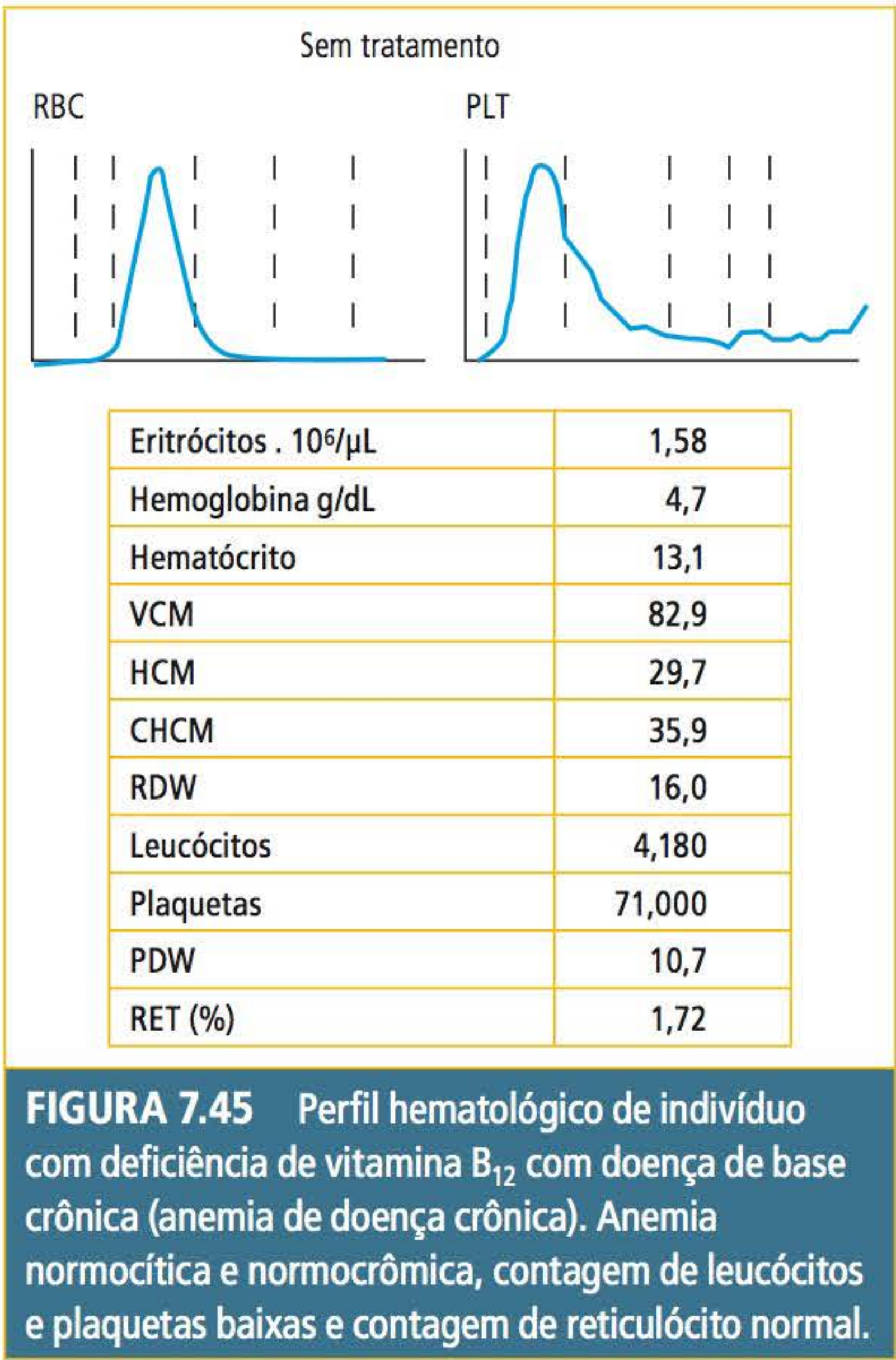
**SEM TRATAMENTO:** A macrocitose está mascarada pela doença de base associada (doença crônica). A população eritroide tem tamanho relativamente homogêneo (RDW 16%), e a variação do tamanho das plaquetas (PDW) também é normal. A contagem de reticulócitos é normal.

**TRATAMENTO 7º DIA:** Após sete dias de tratamento com vitamina B<sub>12</sub>, os parâmetros do eritrograma melhoram, a hemoglobina tem sua concentração duplicada, o histograma RBC (eritrócitos) já demonstra um desvio na direita do gráfico (eritrócitos jovens), o que comprova que a medula está produzindo novas células. Na avaliação das plaquetas, o PDW (variação do tamanho plaquetário) eleva-se, apesar da contagem de plaquetas ainda estar baixa, o que é outro indício de sucesso da terapia.

Entre as modificações dos parâmetros analisados, sem dúvida, a que mais reflete a efetividade da terapia com a vitamina B<sub>12</sub> é a elevação da contagem de reticulócitos. A porcentagem de reticulócitos eleva-se em dez vezes.

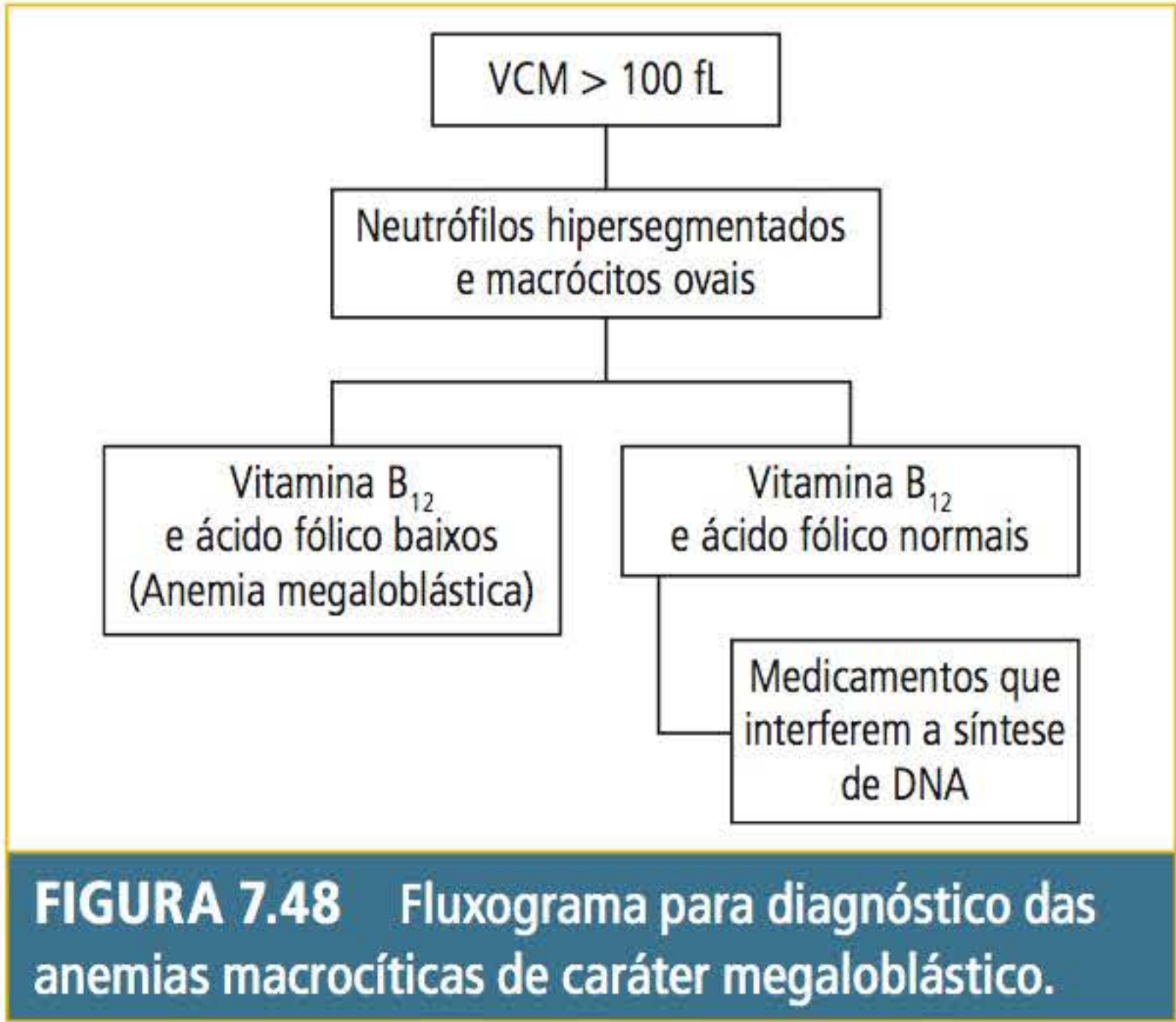
**TRATAMENTO 14º DIA:** Os parâmetros do eritrograma modificaram-se discretamente, po-





rém, analisando o histograma RBC (eritrócitos), é evidente a maior produção de eritrócitos jovens, o que eleva o VCM e, conseqüentemente, a HCM. A contagem de leucócitos e de plaquetas normaliza-se. Tanto o PDW quanto a contagem de reticulócitos, apesar de altos, já demonstram que o pico da recuperação medular já ocorreu.

A **Figura 7.48** ilustra o fluxograma para o diagnóstico das anemias macrocíticas de origem megaloblástica.





ANEMIAS NORMOCÍTICAS E NORMOCRÔMICAS

Frente a um quadro de anemia normocítica e normocrômica, o primeiro exame a ser feito é a contagem de reticulócitos (deve ser analisado pelo valor relativo, absoluto e IPR) para inicialmente separar essas anemias em dois grandes grupos: anemias com atividade de medula óssea (anemias hemolíticas) e anemias sem atividade de medula óssea (anemias não hemolíticas) (Figura 7.49). A classificação das anemias normocíticas e normocrômicas, muitas vezes, é difícil, pois muitas das suas etiologias possuem características variáveis. Por exemplo, é correto classificar as anemias hemolíticas como normocíticas e normocrômicas, mas dependendo da intensidade da hemólise, ela pode apresentar-se com macrocitose (VCM alto) devido aos eritrócitos imaturos (reticulócitos). Portanto, as anemias que serão aqui descritas podem cursar de forma diferente a normocitose e normocromia.

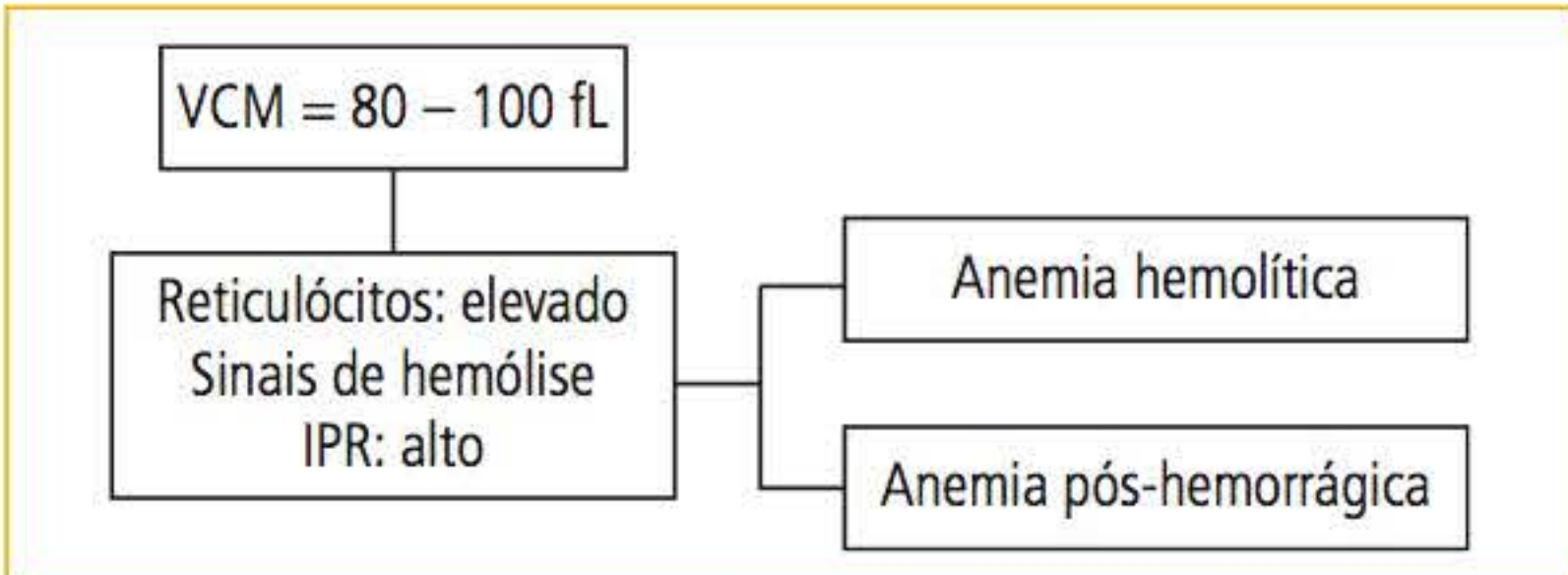


FIGURA 7.49 Fluxograma para o diagnóstico das anemias normocíticas e normocrômicas.

ANEMIAS NORMOCÍTICAS E NORMOCRÔMICAS: IPR AUMENTADO

Anemia pós-hemorragica

As manifestações clínicas da hemorragia dependem de uma série de fatores. Entre os mais importantes, podem-se destacar: (1) a magnitude do evento; (2) o local de origem do sangramento; (3) se existem doenças de base conjuntamente à perda de sangue; e (4) a idade do paciente. Em geral, durante o início de uma hemorragia, predominam eventos relacionados à hipovolemia, em que a anemia, na maioria dos casos, não está presente. Posteriormente, para a restauração do volume sanguíneo, a anemia se instala, e sinais de regeneração da medula estão presentes.<sup>99</sup>

Em geral, um indivíduo saudável suporta a condição sem praticamente nenhum sintoma, e há perda rápida de cerca de 10 a 20% do seu volume

plasmático, aproximadamente, 500 a 1.000 mL de sangue. Acima dessa perda, os sintomas mais comuns são fraqueza, sudorese, náusea e diminuição da frequência e pressão cardíacas, que podem evoluir para a perda da consciência. No Quadro 7.6, estão descritos as relações entre o volume de perda sanguínea e suas consequências clínicas.

QUADRO 7.6 Relação entre o volume perdido de sangue e as manifestações clínicas		
PORCENTAGEM DA PERDA DO VOLUME PLASMÁTICO	VOLUME TOTAL DE SANGUE PERDIDO (APROXIMADO)	SINTOMAS
10%	500 mL	Nenhum
20%	1.000 mL	Taquicardia
30%	1.500 mL	Tontura, hipotensão
40%	2.000 mL	Sede, dificuldade respiratória, sudorese e perda da consciência Pressão venosa central diminuída Palidez de pele
50%	2.500 mL	Choque e morte

Fonte: Adaptado Hillman e Hershko.<sup>100</sup>

O principal objetivo em processos hemorrágicos é restabelecer o volume sanguíneo e prevenir o choque. Isto pode ser obtido pela infusão de soluções intravenosas de eletrólitos e proteínas. Se a hemorragia é intensa, a utilização de concentrado de eritrócitos é a terapia indicada. A resposta a essas ações pode ser avaliada pelo retorno a níveis normais tanto do pulso quanto da pressão sanguínea. No início do processo, a anemia é normocítica e normocrômica, com poucos sinais de regeneração da medula. Após o aumento da secreção da eritropoietina, o número de reticulócitos aumenta, com elevações máximas sendo atingidas entre 6 a 11 dias. O IPR pode chegar a 5. Policromatofilia e macrocitose dependem da quantidade de reticulócitos que são comumente observados. A leucocitose neutrofílica após processos hemorrágicos pode atingir níveis entre 10.000 a 20.000/μL devido principalmente à mobilização de granulócitos do pool marginal.<sup>99</sup>

Anemias hemolíticas

O termo “distúrbios hemolíticos” pode ser definido como condições em que a taxa de destruição dos eritrócitos está aumentada, e a capacidade da



medula óssea em responder a este processo não está prejudicada. Apesar das várias formas já publicadas sobre a classificação das anemias hemolíticas, pelo grande número de doenças e pela variabilidade do quadro laboratorial envolvidas nos estados hemolíticos, nenhum sistema de classificação é totalmente satisfatório. Para melhor compreensão sobre o tema, as anemias hemolíticas serão divididas de duas formas: (1) de acordo com o local da hemólise, ou seja, hemólise intravascular e extravascular; e (2) em adquiridas e congênitas.

### Hemólise predominantemente intravascular

As anemias hemolíticas microangiopáticas denominadas atualmente como anemias hemolíticas com fragmentação eritrocitária,<sup>68</sup> são alterações que ocorrem na microcirculação decorrentes da deposição de trombos. A diminuição da luz do vaso com aumento da pressão sanguínea local leva à fragmentação eritrocitária (anemia hemolítica) e ao consumo de plaquetas (trombocitopenia).<sup>31</sup> A anemia hemolítica com fragmentação eritrocitária pode ocorrer na púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), na síndrome hemolítico-urêmica (SHU), durante a gestação, câncer ou ser induzida por quimioterapia.<sup>68</sup>

Tanto na PTT quanto na SHU ocorre anemia hemolítica com fragmentação eritrocitária e trombocitopenia, podendo haver ainda alterações neurológicas, renais e febre.<sup>101</sup>

Os multímeros do fator de von Willebrand são produzidos pelos megacariócitos e estocados pelos grânulos alfa das plaquetas e pelos corpos de Weibel-Palade, localizados na célula endotelial. Estes multímeros são muito grandes com relação aos encontrados no plasma e são secretados para o subendotélio associando-se à matriz extracelular. Quando o subendotélio é exposto ao lúmen vascular, esses multímeros induzem a agregação plaquetária.<sup>31</sup> Quando esses multímeros são secretados para o lúmen vascular, são clivados por uma metaloprotease chamada de ADAMTS 13, que é produzida no hepatócito e o gene está localizado no cromossomo 9q34.<sup>102</sup> O evento inicial que leva ao quadro clínico de PTT é a presença de multímeros de alto peso molecular do fator de von Willebrand no plasma dos pacientes. Os multímeros de alto peso molecular são encontrados em função da deficiência da metaloprotease que cliva o fator de von Willebrand, que pode ser herdada ou adquirida (inibição por autoanticorpos).<sup>101</sup> Os multímeros de alto peso molecular são capazes de induzir a agre-

gação plaquetária, que pode se tornar disseminada, levando à obstrução vascular por formação de trombo plaquetário, o que aumenta a reatividade da plaqueta ao fator de von Willebrand. Esse trombo é rico em plaquetas e fator de von Willebrand e há pouca ou nenhuma evidência de fibrina.<sup>68</sup> A cascata da coagulação não é ativada porque não há lesão da célula endotelial. Este é o mecanismo primário da PTT. A presença de esquizócitos é outro achado importante da PTT, principalmente quando associado à trombocitopenia.

A fragmentação ocorre pela obstrução da microcirculação. O eritrócito, ao passar pelo vaso obstruído, fragmenta-se, caracterizando a hemólise, que pode levar a um quadro de anemia, dependendo da intensidade daquela. A presença de outra protease com atividade de cisteína, que não está presente no plasma normal e que também causa agregação e secreção plaquetária, foi descrita nesses pacientes. O critério clínico para diagnóstico da PTT é anemia hemolítica com fragmentação eritrocitária e trombocitopenia.<sup>101</sup>

A SHU está associada com hemólise intravascular aguda e falência renal.<sup>33</sup> A doença renal é causada pela deposição de trombos plaquetários nas arteríolas e no lúmen dos capilares glomerulares. A SHU da infância associada a *Escherichia coli* 0157:H7 ou *Shigella dysenteriae* é causada após uma infecção entérica aguda (mais comum em crianças; porém, com prognóstico pior quando acomete adultos). A progressão da enterocolite por *Escherichia coli* 0157:H7 para SHU ocorre em 2 a 7% dos casos esporádicos e em torno de 30% nos casos epidêmicos.<sup>101</sup> O mecanismo primário da SHU é a lesão endotelial, pela toxina bacteriana, na microcirculação renal, que leva à morte da célula endotelial e exposição do subendotélio com consequente ativação plaquetária e da cascata da coagulação; o trombo formado é rico em plaquetas e fibrina.<sup>68</sup> Os achados laboratoriais são falência renal aguda, anemia hemolítica com presença de esquizócitos e trombocitopenia.<sup>101</sup> A metaloprotease ADAMTS 13 não está diminuída e nem a sua atividade está reduzida.<sup>68</sup> Os sintomas hemorrágicos esperados são hematúria, epistaxe, sangramento gastrointestinal e menorragia; laboratorialmente, além de anemia, esquizócitos e trombocitopenia, o paciente mostra aumento da bilirrubina indireta e da LDH (devido à hemólise e necrose tecidual), podendo haver hematúria e proteinúria. Pela ativação da cascata da coagula-



ção, o fragmento 1+2 da protrombina e o D-dímero estão aumentados. Tanto na PTT quanto na SHU a hemólise que ocorre pode ou não levar a uma anemia, e esta, quando presente, pode ser bastante grave.<sup>101</sup> A instalação ou não da anemia decorre da intensidade de hemólise e da capacidade de resposta da medula óssea. Ocorre reticulocitose, policromatofilia, anisocitose com aumento do RDW, presença de equinócitos, esferócitos (em pequena quantidade) e esquizócitos, cuja intensidade é proporcional à hemólise.<sup>32</sup> O VCM pode ser muito variável devido à reticulocitose, fragmentos eritrocitários e células normais.<sup>32</sup> A hemoglobinememia pode ser bastante acentuada e geralmente se correlaciona com o grau de anemia e com as alterações morfológicas eritrocitárias; a hemoglobinúria e a hemossiderinúria estão presentes.<sup>33</sup> Pode haver um aumento, mas geralmente não excede 2 ou 3 mg/dL, da bilirrubina indireta<sup>33</sup> devido à retirada dos fragmentos eritrocitários pelo baço. Na SHU, tanto a ureia quanto a creatinina estão elevadas, e há a presença dos produtos de degradação do fibrinogênio e fibrina representados pela presença do fragmento 1+2 da protrombina e do D-dímero.<sup>68</sup>

Três situações relacionadas com a fragmentação eritrocitária podem ocorrer na gestação: síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas e contagem de plaquetas diminuídas [do inglês H, *hemolysis*, EL, *elevated liver enzymes* e PL, *low platelets count*]), PTT da gestação e SHU no pós-parto.<sup>68</sup>

O quadro de pré-eclâmpsia pode ser definido como a presença de hipertensão com proteinúria e/ou edema; é uma doença sistêmica que envolve alterações renais, hepáticas, cardíacas e do sistema nervoso central. O quadro de eclâmpsia estabelece-se a partir de alterações neurológicas agudas na mulher pré-eclâmpsica. Pacientes com quadro de pré-eclâmpsia/eclâmpsia são consideradas portadoras da síndrome HELLP.<sup>103</sup> O que desencadeia a síndrome HELLP é a associação da hipertensão com a lesão ao endotélio e a deposição de fibrina no endotélio lesado. Esta situação caracteriza-se por obstrução do vaso (formação de trombo de fibrina) com consequente fragmentação eritrocitária, consumo de plaquetas no local lesionado (trombocitopenia) e ativação da cascata da coagulação (coagulação intravascular crônica). A deposição de fibrina ocorre no rim e no fígado.<sup>68</sup>

A PTT (gestação) ou a SHU (pós-parto) são diferenciadas pelo comprometimento renal que

ocorre na segunda situação. O esperado laboratorialmente é uma anemia hemolítica com presença de esquizócitos, trombocitopenia e presença de D-dímeros e aumento de ureia e creatinina na SHU.<sup>101</sup> Em carcinomas disseminados, pode ocorrer a instalação de um quadro de anemia hemolítica com fragmentação eritrocitária e trombocitopenia. O mecanismo primário é a proliferação das células transformadas na camada íntima dos vasos, sendo que o tecido mais acometido é o pulmão. Essa proliferação altera o fluxo sanguíneo local fazendo fragmentação eritrocitária e ativação plaquetária com formação de trombo plaquetário e consumo de plaquetas.<sup>33</sup> Pode, não necessariamente, ocorrer deposição de fibrina e evolução para um quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD).<sup>68</sup> Já foi descrita a presença de multímeros de alto peso molecular do fator de von Willebrand e deficiência da enzima ADAMTS 13.<sup>104</sup>

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença hemolítica adquirida, rara e crônica em que as células apresentam uma sensibilidade ao complemento acarretando hemólise e lise de granulócitos e plaquetas.<sup>32</sup> É uma doença caracterizada por uma transformação clonal de célula-tronco; por isto, as três linhagens estão afetadas. Apresenta hemólise extravascular crônica com episódios de hemólise intravascular, caracterizados por hemoglobinúria.<sup>31</sup>

A incompatibilidade pelo sistema sanguíneo ABO é caracterizada por uma reação hemolítica transfusional imediata porque o sistema ABO se caracteriza por ter anticorpos naturais.<sup>31</sup> Quando o eritrócito incompatível está presente na circulação, a reação antígeno-anticorpo é imediata porque ocorre a ativação do sistema complemento com consequente lise eritrocitária. Os anticorpos do tipo IgM ou IgG, com especificidade ABO, são ativadores do complemento especificamente da via clássica.<sup>68</sup>

O *Plasmodium* tem um tropismo pelas células da série vermelha porque ele pode ligar-se a receptores específicos na membrana citoplasmática: o *P. vivax* e o *P. ovale* infectam apenas reticulócitos, o *P. malarie* invade eritrócitos e o *P. falciparum* invade todas as células da série vermelha.<sup>68</sup> O receptor específico para o *P. vivax* é o grupo sanguíneo Duffy, em locais onde o antígeno Duffy não está expresso nos eritrócitos (algumas regiões da África); a malária causada pelo *P. vivax* não é en-



contrada.<sup>105</sup> A anemia na malária ocorre pela destruição eritrocitária causada pelo próprio parasita,<sup>106</sup> pela retirada das células infectadas pelo baço,<sup>24</sup> pela diminuição da produção eritrocitária devido ao quadro inflamatório<sup>23</sup> e pela produção inadequada de eritropoietina.<sup>107</sup> Existe um componente de hemólise extra e intravascular, sendo que o último é menos intenso.<sup>68</sup>

O veneno da *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) produz um quadro dermonecrótico local que pode evoluir para um quadro sistêmico com falência renal, anemia hemolítica e coagulação intravascular disseminada.<sup>27</sup> Laboratorialmente, podem ser evidenciados anemia hemolítica, hemoglobinemias, hemoglobinúria, aumento da bilirrubina indireta, leucocitose e proteinúria. A análise histopatológica da lesão dermonecrótica caracteriza-se por acúmulo de neutrófilos e eritrócitos, sugerindo perda da integridade vascular e coagulação intravascular.<sup>108</sup> O veneno promove agregação plaquetária e trombocitopenia.<sup>109</sup> O veneno de certas serpentes está relacionado com um quadro de hemólise intravascular (hemoglobinemias, hemoglobinúria) e sangramentos devido à ativação dos fatores de coagulação. O veneno das abelhas africanas está relacionado à falência renal e anemia hemolítica.<sup>68</sup>

Certos microrganismos podem estar relacionados com um quadro de hemólise como o *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e a *Salmonella*. A hemólise pode ser ocasionada também pela adsorção de produtos bacterianos (lipopolissacarídeos) pelo eritrócito.<sup>57</sup>

Determinados medicamentos podem causar hemólise, e o mecanismo de destruição eritrocitária pode ocorrer pela formação de complexos imunes nos quais o fármaco ligado a uma proteína plasmática suscita a formação de um anticorpo. O complexo fármaco, proteína e anticorpo deposita-se no eritrócito e causa a hemólise intravascular; o anticorpo formado é da classe IgM e ativa o complemento. Outro tipo de mecanismo é o medicamento ligar-se a um receptor da membrana eritrocitária e suscitar a formação de um anticorpo, geralmente do tipo IgG, com hemólise menos grave que o primeiro mecanismo. O medicamento  $\alpha$ -metildopa, usado como anti-hipertensivo, causa uma anemia hemolítica mediada por anticorpo autoimune. O fármaco suscita a formação de um anticorpo, que reage com receptores na membra-

na eritrocitária e, quando o medicamento é administrado por mais de três meses, em torno de 20 a 30% dos pacientes desenvolvem a anemia hemolítica por autoanticorpos. O teste de Coombs direto é positivo em todos os mecanismos descritos.<sup>110</sup>

Nas próteses cardíacas e na hemoglobinúria da marcha, a hemólise é causada por trauma mecânico. No primeiro, é a prótese que lisa o eritrócito e no segundo, é o atrito do pé ao chão. Nas duas situações, a anemia pode ser grave, e a hemoglobinúria faz-se presente como também os esquizócitos.<sup>32</sup> Na hemoglobinúria da marcha, os atletas corredores de longa distância podem desenvolver também uma anemia ferropriva devido à hemossiderinúria. Nas queimaduras, a hemólise está associada a quadros de terceiro grau com mais de 15 a 20% da superfície corpórea comprometida.<sup>68</sup>

De modo geral, na hemólise intravascular, os achados laboratoriais são VCM variável, RDW aumentado, anisocitose, policromatofilia, pecilocitose representada pela presença de esquizócitos, equinócitos e esferócitos, reticulocitose, trombocitopenia, hemoglobinúria, hemossiderinúria, hemoglobinemias, hematúria, proteinúria, aumento da desidrogenase láctica, presença de D-dímero e aumento de ureia e creatinina.<sup>31</sup> A hemossiderinúria é um marcador de hemólise intravascular crônica porque pode estar presente na urina, mesmo na ausência de hemoglobinúria. Para a formação da hemossiderina, a hemoglobina é reabsorvida pelo tecido renal para posteriormente reexcretar o ferro.

Hemólise predominantemente extravascular

As anemias de hemólise extravascular podem ser divididas em hereditárias e adquiridas. O **Quadro 7.7** ilustra a classificação dos distúrbios hemolíticos hereditários relacionados a anormalidades na estrutura da membrana do eritrócito.

QUADRO 7.7 Principais causas de distúrbios hemolíticos relacionados a defeitos na membrana eritrocitária	
Distúrbios hemolíticos hereditários	
Defeitos na membrana eritrocitária	
1. Esferocitose hereditária	
2. Eliptocitose hereditária	
3. Abetalipoproteinemia (acantocitose)	
4. Estomatocitose hereditária	
5. Deficiência de LCAT	
6. Doença do Rh nulo	



## Membranopatias

Entre os defeitos estruturais da membrana eritrocitária, podem-se destacar a esferocitose, a eliptocitose, os transtornos de permeabilidade iônica, os defeitos dos antígenos da membrana e alterações da composição lipídica da membrana.

### Esferocitose hereditária

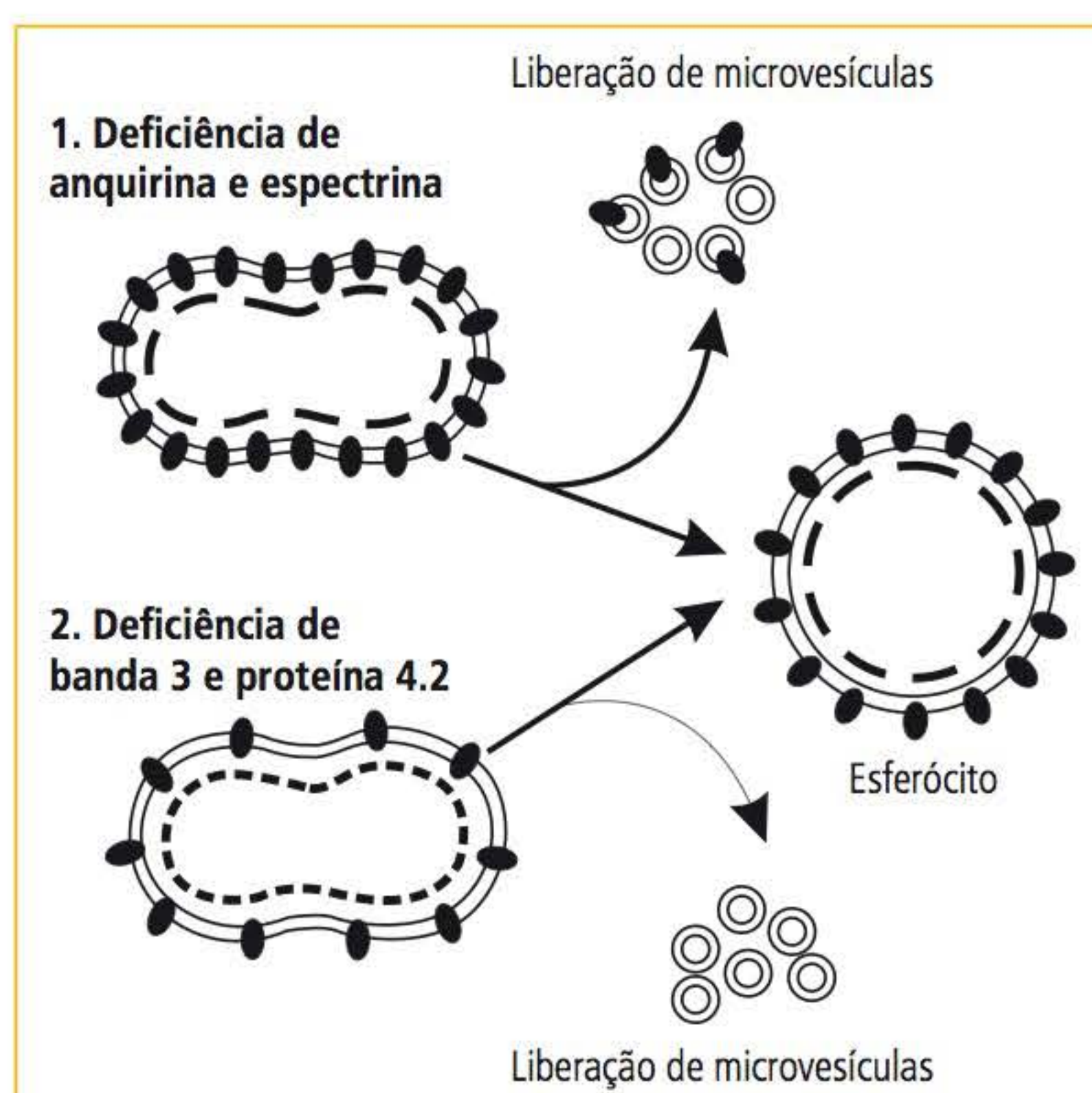
A esferocitose hereditária ocorre em todos os grupos raciais e étnicos, sendo a anemia hereditária mais comum em indivíduos do norte da Europa. Nos Estados Unidos e na Inglaterra, aproximadamente um a cada 2.500 indivíduos apresenta essa anormalidade de membrana. Homens e mulheres são afetados igualmente.

A principal característica da esferocitose hereditária é a perda da área de superfície da membrana eritrocitária em relação ao volume intracelular, o que predispõe o eritrócito a perder sua deformabilidade, além de mudar seu formato original (formato oval). Esse quadro se deve a defeitos nas proteínas que constituem a membrana, principalmente as proteínas anquirina, banda 3,  $\beta$ -espectrina,  $\alpha$ -espectrina e proteína 4.2.<sup>111</sup>

A forma mais frequente de esferocitose hereditária (80% dos casos) apresenta herança autossômica dominante, enquanto a forma autossômica recessiva é encontrada nos casos restantes (20%). A forma dominante apresenta grande variabilidade clínica e boa resposta à esplenectomia; já a forma recessiva pode apresentar anemia discreta (indivíduos heterozigotos) ou anemia intensa em homozigotos.<sup>112</sup>

O defeito genético mais comum na transmissão dominante é uma mutação no gene da anquirina (50% dos casos), seguido de mutações no gene da  $\beta$ -espectrina (30%) e no gene da proteína de membrana banda 3 (cerca de 20%). As formas recessivas associam-se particularmente com a heterozigose para mutação da  $\alpha$ -espectrina, mas também com mutações dos genes da banda 3, da  $\beta$ -espectrina e da proteína 4.2 (**Figura 7.50**).<sup>6</sup>

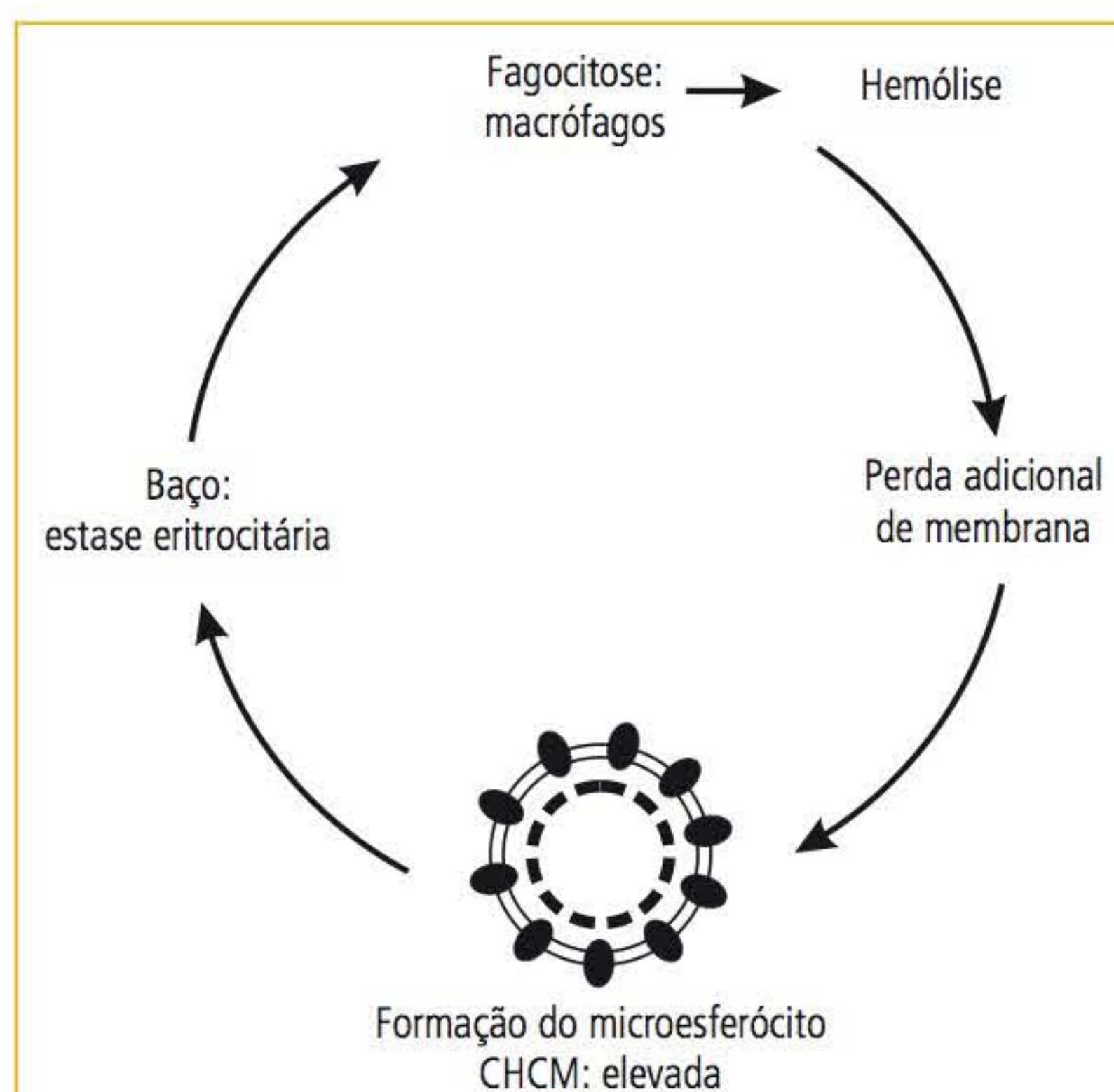
Os esferócitos, em sua maioria, ficam retidos no baço, causando seu acúmulo na polpa esplênica. Esta estase eritrocitária é o verdadeiro mecanismo fisiopatológico da hemólise observada na esferocitose hereditária. No baço, o esferócito tem disponibilidade diminuída de glicose, o que cria um ambiente metabolicamente estressante, sendo facilmente fagocitado pelos macrófagos, o que amplifica o estado hemolítico. Os esferócitos que conseguem passar pelo baço perdem uma parte de sua membrana,



**FIGURA 7.50** Principais deficiências de proteínas de membrana eritrocitária que causam a esferocitose hereditária.

Fonte: Adaptada de Gallagher.<sup>111</sup>

transformando-se em microesferócitos (**Figura 7.51**), que apresentam CHCM acima de 35g/L.<sup>112</sup>



**FIGURA 7.51** Mecanismo de formação do microesferócito.

Fonte: Adaptada de Gallagher.<sup>111</sup>

Os sintomas clínicos são muito variáveis: o paciente pode apresentar anemia de discreta a intensa, ou não ter anemia, icterícia intermitente e esplenomegalia. O quadro clínico da doença (anemia variável, icterícia e esplenomegalia) pode se manifestar ao nascimento, na infância e mesmo



em idade avançada. A esferocitose pode ser classificada clinicamente em leve, moderada e intensa.<sup>33</sup> A esferocitose leve ocorre em 20 a 30% dos pacientes que apresentam um padrão de herança autossômico dominante. Não apresentam anemia porque a hemólise é crônica e compensada: a medula óssea consegue equilibrar o que está sendo destruído com o aumento da produção e a esplenomegalia é pouco evidente ou ausente. Esses pacientes geralmente são diagnosticados quando apresentam um quadro hematológico de crise de hemólise ou de aplasia de medula óssea. No quadro de anemia moderada, o paciente apresenta uma hemólise crônica, os esferócitos são observados na extensão sanguínea, o paciente apresenta esplenomegalia e icterícia, o que ocorre em aproximadamente 60 a 75% dos casos de esferocitose hereditária. No quadro de anemia intensa, a hemoglobina está muito baixa (abaixo de 6 g/dL), o paciente apresenta icterícia, esplenomegalia e os esferócitos estão presentes em grande quantidade na extensão sanguínea. A **Figura 7.52** demonstra as várias apresentações clínicas e laboratoriais da esferocitose hereditária.

Características laboratoriais

Os achados laboratoriais da esferocitose são muito variáveis devido à complexidade das mutações genéticas que a originam. Dependendo da anormalidade genética, pode haver anemia hemolítica ou hemólise compensada, com a extensão sanguínea demonstrando graus variados da presença dos esferócitos. Nos casos leves, os esferócitos não são abundantes, enquanto nos estados graves sua presença é abundante, cursando com policromatofi-

lia e macrócitos policromáticos. A **Figura 7.53** ilustra a presença marcante de esferócitos em uma extensão sanguínea.



FIGURA 7.53 Morfologia dos esferócitos.

A CHCM está aumentada como resultado da desidratação celular leve, e este aumento não é afetado pela esplenectomia. O VCM é muito variável, podendo ser muito baixo ou tão alto quanto 125 fL, o que depende da quantidade de reticulócitos. Como o VCM tem esta ampla variação, a HCM também apresenta perfil inconstante. A variação da contagem está ilustrada na **Figura 7.52** e é dependente na alteração genética envolvida.

Os esferócitos apresentam fragilidade osmótica aumentada pela baixa relação da área da superfície da membrana com o seu volume. Os esferócitos têm pequena capacidade de suportar a entrada de água quando eles são submetidos a soluções hipotônicas. A concentração salina na qual a hemólise começa varia de aproximadamente 0,5 a 0,7 g/dL. O grau da fragilidade osmótica correlaciona-se

Parâmetros laboratoriais	Portador assintomático	Esferocitose leve	Esferocitose moderada	Esferocitose moder. severa	Esferocitose severa
Hemoglobina (g/dL)	Normal	11 a 15 g/dL	8-12 g/dL	6-8 g/dL	< 6 g/dL
Reticulócitos (%)	1,0-3,0%	3,0-8,0%	±8%	> 10%	10%
Bilirrubina (mg/dL)	0-1,0	1-2,0	±2,0	2-3,0	> 3
Extensão sanguínea	Normal	Poucos esferócitos	Esferocitose	Esferocitose	Esferocitose e pecilocitose
Fragilidade osmótica	Normal	Normal ou ligeiramente aumentada	Aumentada	Aumentada	Aumentada

FIGURA 7.52 Características laboratoriais nas várias formas clínicas da esferocitose hereditária.



bem com a intensidade da esferocitose; portanto, nos portadores assintomáticos e leves, a curva da fragilidade osmótica pode apresentar-se normal. Os níveis séricos de bilirrubina não conjugada estão aumentados, e o teste de Coombs é negativo. A medula óssea apresenta hiperplasia eritroide.

#### Complicações na esferocitose hereditária

Os pacientes com esferocitose hereditária apresentam três situações que comprometem a qualidade de vida e que muitas vezes podem apresentar um quadro clínico grave: crise hemolítica, crise aplásica e crise megaloblástica.<sup>68</sup> A crise de hemólise caracteriza-se por uma hemólise abrupta que pode ser grave, caracterizada por esplenomegalia, icterícia, queda da concentração de hemoglobina, reticulocitose e aumento de esferócitos no sangue periférico. Dependendo da intensidade da crise de hemólise, a medula óssea libera reticulócitos muito jovens para a circulação, e o VCM pode aumentar, caracterizando um quadro de pseudomacrocitose que geralmente não ultrapassa valores acima de 105 fL.<sup>31</sup>

Este quadro pode ser exemplificado em pacientes portadores de esferocitose hereditária que fora dos períodos de crise cursam com concentração de hemoglobina normal; porém, nos momentos críticos, clinicamente os pacientes apresentam icterícia, esplenomegalia, cansaço e mal-estar, com VCM e CHCM aumentados, policromatofilia, reticulocitose, bilirrubinemia e numerosos esferócitos na extensão sanguínea.

A crise aplástica está relacionada com infecções virais, e o agente viral mais comum é o parvovírus B19,<sup>35</sup> que infecta os progenitores eritrocitários, comprometendo a proliferação e a diferenciação celular. A crise aplástica está relacionada com um quadro de pancitopenia que pode levar a um quadro de anemia intensa.<sup>57</sup>

A crise megaloblástica está relacionada com o consumo dos estoques de folato, o que pode ocorrer pelas frequentes crises de hemólise.<sup>57</sup> É interessante notar que durante a crise megaloblástica o paciente apresenta um quadro característico de anemia macrocítica megaloblástica, mas podem ser vistos esferócitos no sangue periférico.

O teste da fragilidade osmótica é utilizado para o diagnóstico da esferocitose e mostra um aumento da curva da fragilidade tanto no teste imediato quanto na pós-incubação (37 °C por 24 horas). O esferócito não é observado somente na esferocitose, mas também em outras patologias, como a anemia

hemolítica mediada por anticorpos e, nestas patologias, a fragilidade mostra-se aumentada. Um teste mais específico é a eletroforese de proteínas de membrana que detecta e quantifica a proteína deficiente, e mais específico ainda é a detecção da mutação gênica por biologia molecular.

O tratamento para esses pacientes é a esplenectomia, a qual não cura o paciente, pois este continuará a produzir esferócitos, mas sem o baço não ocorrerá hemólise extravascular. A necessidade da esplenectomia deve ser avaliada para cada paciente levando em conta as manifestações clínicas da doença e a idade do paciente.

#### Eliptocitose hereditária

A eliptocitose é uma doença de caráter autossômico dominante e sua frequência tende a ser maior do que a esferocitose hereditária. Estudos epidemiológicos indicam que, na região norte da Europa, a incidência da eliptocitose é duas vezes maior que a esferocitose hereditária. Em mais de 30% da população aborígine do sudeste asiático a eliptocitose hereditária está presente. No geral, um caso de eliptocitose hereditária ocorre a cada 5 mil nascimentos.<sup>112</sup> A eliptocitose hereditária pode ser classificada, de maneira geral, em quatro grandes grupos: (1) eliptocitose hereditária comum; (2) piroptocitose; (3) eliptocitose esferocítica; e (4) eliptocitose estomatocítica (**Quadro 7.8**).

#### QUADRO 7.8 Formas clínicas da eliptocitose hereditária

##### Eliptocitose congênita comum

- Assintomática
- Hemólise moderada
- Hemólise esporádica
- Hemólise crônica

##### Piroptocitose congênita

- Hemólise intensa

##### Eliptocitose esferocítica

- Heterozigota
- Homozigota

##### Eliptocitose estomatocítica

- Ovalocitose asiática

As proteínas envolvidas nessas patologias são espectrina, proteína 4.1 e glicoforina C. A espectrina participa tanto das interações verticais quanto das horizontais; a proteína 4.1 participa das interações horizontais; e a glicoforina C, das verticais. As alterações mais comuns estão relacionadas com mutações no gene da espectrina, seguidas de mutações na proteína 4.1 e, por fim, as da glicoforina C.



O eliptócito forma-se na corrente circulatória, não sendo liberado nesta forma da medula óssea, adquirindo essa forma após passar pelos sinusoides do baço ou pela microcirculação.<sup>57</sup>

- **Eliptocitose hereditária comum:** É a forma mais frequente de eliptocitose hereditária em nosso meio e tem expressividade clínica que varia de totalmente assintomática a casos de hemólise intensa.<sup>112</sup> Episódios de hemólise esporádica são observados em alguns indivíduos durante infecções, na gravidez, no puerpério ou quando a microcirculação fica comprometida, por exemplo, por esplenomegalia, coagulação intravascular disseminada ou na PTT.

#### Características laboratoriais

A patologia é, muitas vezes, descoberta pela visualização de muitos eliptócitos na extensão sanguínea (variando entre 15 a 100%). A concentração de hemoglobina e as constantes corpusculares (VCM, HCM e CHCM) são normais. A contagem de reticulócitos geralmente não está aumentada, e nos casos de crises hemolíticas o RDW pode elevar-se. Como a gravidade da eliptocitose varia consideravelmente, sinais de hemólise podem ser evidenciados, como policromatofilia e elevação na contagem de reticulócitos.<sup>6</sup> Em torno de 5 a 20% dos casos ocorre uma anemia hemolítica que varia de moderada a intensa com hemoglobina variando de 9 a 12 g/dL e contagem de reticulócitos entre 20 a 25%.<sup>57</sup>

- **Piropoiquilocitose hereditária:** É uma doença de herança autossômica recessiva, rara, que se caracteriza por anemia hemolítica intensa com presença de microesferócitos, microeliptócitos e piropoiquilócitos. Em função dos piropoiquilócitos, o VCM pode ser extremamente baixo (entre 30 a 50 fL), a hemoglobina fica entre 5 a 9 g/dL, a contagem de reticulócitos entre 13 a 35%, e o RDW apresenta elevação.<sup>57</sup> O nome dessa doença vem do fato de os eritrócitos normais suportarem uma temperatura de até 49°C. Na piropoiquilocitose, os eritrócitos fragmentam-se em temperaturas entre 45 a 46 °C.<sup>32</sup> A fragilidade osmótica está aumentada.<sup>31</sup>
- **Eliptocitose esferocítica:** Este termo é utilizado para descrever uma variante da eliptocitose que é caracterizada morfológicamente por células que são mais arredondadas do que microesferócitos e microelip-

tócitos. São observados na extensão sanguínea tanto eliptócitos quanto esferócitos. Os indivíduos afetados apresentam processo hemolítico não compensado e predisposição para crises aplásticas. Como na esferocitose hereditária, a fragilidade osmótica é aumentada. Estudos em algumas famílias portadoras da doença apontaram para a deficiência da proteína 4.1. Como tratamento, indica-se a esplenectomia, que na maioria dos casos é curativa.<sup>113</sup>

- **Ovalocitose asiática:** Também denominada ovalocitose hereditária, é um distúrbio distinto e homogêneo que ocorre na Nova Guiné, nas Ilhas Salomão, em populações da Indonésia e das Filipinas. A herança é autossômica dominante. O defeito genético é a deleção no gene da banda 3, que causa a ligação desta proteína com a anquirina, reduzindo sua mobilidade e rigidez. Na maioria dos casos, não há anemia. Os eritrócitos são redondos ou ovais e é comum a presença de estomatócitos na extensão sanguínea.<sup>6</sup>

#### Estomatocitose hereditária

Os estomatócitos são eritrócitos que apresentam uma fenda central ou estroma em vez de uma área circular de palidez. O aumento do número de estomatócitos ocorre em dois grupos distintos, ambos caracterizados por doença hemolítica leve a moderada, (1) uma associada com aumento na concentração intracelular de sódio e água e redução do potássio e (2) outra associada à ausência de antígenos do grupo sanguíneo Rh (fenótipo do Rh nulo).<sup>113</sup> É uma doença que se caracteriza por hemólise crônica, mas discreta. O VCM está aumentado, a CHCM está normal ou diminuída, e o sangue periférico pode apresentar de 10 a 50% de estomatócitos.<sup>57</sup> A fragilidade osmótica está aumentada na maioria dos casos, mas já foram descritos casos de estomatocitose com fragilidade osmótica normal.<sup>113</sup>

- **Doença do Rh nulo:** O antígeno Rh é importante para a integridade funcional dos eritrócitos e sua ausência predispõe a célula a mudar a sua forma. A doença é caracterizada por anemia hemolítica normocrômica, normocítica leve. Os estomatócitos são observados em abundância na extensão sanguínea e a fragilidade osmótica é aumentada.<sup>113</sup>

O **Quadro 7.9** demonstra as principais características hematológicas dos principais distúrbios genéticos de membrana eritrocitária.



**QUADRO 7.9** Critérios hematológicos das principais membranopatias

ALTERAÇÃO	EXTENSÃO SANGÜÍNEA	VCM	CHCM	FRAGILIDADE OSMÓTICA
▪ Esferocitose hereditária	▪ Esferócitos	▪ Normal ou diminuído	▪ Aumentada	▪ Aumentada
▪ Eliptocitose hereditária	▪ Ovalócitos ▪ Eliptócitos	▪ Normal ou diminuído	▪ Normal ou aumentada	▪ Normal
▪ Piropoiquilcitose hereditária	▪ Dacriócitos ▪ Esquizócitos ▪ Esferócitos	▪ Muito diminuído	▪ Muito elevada	▪ Muito aumentada
▪ Estomatocitose hereditária	▪ Estomatócitos	▪ Normal ou elevado	▪ Diminuída	▪ Aumentada

Alterações na composição lipídica da membrana eritrocitária

São condições raras e caracterizadas por **alterações na estrutura lipídica da membrana eritrocitária**. Destacam-se neste grupo a (1) deficiência congênita da lecitina colesterol acil transferase (LCAT), (2) a abetalipoproteinemia e (3) acantocitose hepatopática.

- **Deficiência de LCAT:** É um transtorno autossômico dominante muito raro. A lecitina colesterol acil transferase é uma enzima que catalisa a transformação dos ácidos graxos em colesterol. Os indivíduos portadores da deficiência de LCAT apresentam anemia de caráter hemolítico discreto, e o achado morfológico mais abundante são os codócitos, cuja membrana contém um grande conteúdo de colesterol e fosfolípidos.
- **Abetalipoproteinemia:** É caracterizada por uma deficiência na secreção hepática de apolipoproteína B e se transmite de forma autossômica recessiva. Com a ausência de apolipoproteína B, todas as frações lipoproteicas que a contêm apresentam-se em quantidades diminuídas. Na membrana eritrocitária, a alteração mais característica é o aumento da esfingomielina, que provavelmente seja a causa da alteração na forma do eritrócito, conhecida como acantócito (*spurr cells*). A anemia é hemolítica de caráter discreto com grande quantidade de acantócitos na extensão sanguínea.
- **Acantocitose hepatopática:** Nos distúrbios que afetam a função hepática, pode ocorrer aumento da deposição de colesterol na membrana eritrocitária, o que também pode causar anemia de caráter hemolítico.

### Eritroenzimopatias

O eritrócito contém muitas enzimas cruciais para manter a sua integridade. As vias enzimáticas mais importantes são a via glicolítica, que fornece energia, e o *shunt* da pentose que protege contra o dano oxidante. Existem ainda outras enzimas relacionadas ao metabolismo dos nucleotídeos. Deficiências em qualquer das vias podem causar anemia hemolítica hereditária não esferocítica.<sup>6</sup> As alterações na via das pentoses e do metabolismo da glutathione dão origem a síndromes hemolíticas que têm em comum a geração comprometida de glutathione reduzida (GSH) e possuem como consequência a desnaturação oxidativa da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito. As crises hemolíticas geralmente iniciam-se por certos fármacos, infecções e outros fatores extrínsecos ao eritrócito. A mais bem caracterizada das enzimopatias é a deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD).

Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD)  
A G6-PD tem como função essencial a redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) a NADPH, necessária para a redução da GSSG a GSH. O gene que determina a G6-PD está localizado no cromossomo X, com estrutura contendo 13 éxons, que codificam uma proteína de 515 aminoácidos. A deficiência de G6-PD é o distúrbio metabólico mais comum nos eritrócitos, tendo distribuição global, porém com maior incidência nas zonas tropical e subtropical do hemisfério oriental. A incidência da deficiência da G6-PD é de aproximadamente 20% nos negros africanos de aldeias denominadas BAN, 12% nos negros americanos e 8% nos negros brasileiros. Devido à alta incidência da deficiência de G6-PD em regiões endêmicas de malária, considera-se que essa deficiência confere uma vantagem seleti-



va contra a infecção. Poucos levantamentos populacionais têm considerado os polimorfismos genéticos da deficiência de G6-PD, mas tem sido sugerido que, na África, a deficiência é resultado da variante denominada A- e que, nos países do Mediterrâneo, é resultado do polimorfismo denominado G6PD Mediterrânea, uma variante da classe II da G6PD.<sup>114,115</sup>

A finalidade da G6-PD é manter os níveis de glutathiona reduzida (GSH) elevados; com isso, os radicais livres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que se formam no eritrócito são transformados em água, evitando, desta forma, o estresse oxidativo. É uma doença de herança ligada ao sexo (cromossomo X) que afeta 400 milhões de pessoas e é considerada a doença metabólica mais comum dos eritrócitos.<sup>68</sup> É uma doença com muitas variantes descritas e que se caracteriza por crises de hemólise quando o paciente é submetido a agentes oxidantes, como medicamentos, fava do feijão e frente a processos infecciosos. A enzima normal é designada por G6-PD B. A Organização Mundial da Saúde classifica a deficiência da G6-PD em classes de I a V. A classe I inclui os pacientes que apresentam deficiência enzimática grave e anemia hemolítica crônica. À classe II pertencem os pacientes com deficiência enzimática grave, mas com hemólise intermitente. Os da classe III têm deficiência enzimática moderada com hemólise intermitente associada a medicamentos e drogas. Os pacientes da classe IV são mutantes para G6-PD, mas não têm deficiência enzimática e nem hemólise. Os da classe V apresentam uma concentração aumentada da enzima, tanto os pacientes da classe IV quanto os da V são assintomá-

ticos. A **Tabela 7.10** resume as características da classificação das deficiências de G6-PD.

O **Quadro 7.11** mostra os medicamentos que estão associados à hemólise nos pacientes das classes I, II e III.

QUADRO 7.11 Medicamentos que estão associados com hemólise em pacientes com deficiência de G6-PD das classes I, II e III	
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Acetanilida</li><li>▪ Furazolidona</li><li>▪ Azul de metileno</li><li>▪ Ácido nalidíxico</li><li>▪ Naftaleno</li><li>▪ Nitrofurantoína</li><li>▪ Fenazopiridina</li><li>▪ Fenilhidrazina</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Primaquina</li><li>▪ Sulfacetamida</li><li>▪ Sulfametoxazol</li><li>▪ Sulfanilamida</li><li>▪ Sulfapiridina</li><li>▪ Tiazolsulfona</li><li>▪ Azul de toluidina</li><li>▪ Trinitrotolueno</li></ul>

A indução de hemólise também está associada a infecções e, entre os agentes infecciosos indutores de hemólise estão: salmonela, *Escherichia coli*, estreptococo β-hemolítico, riquetsias e vírus da hepatite. A exposição a *Vicia fava*, espécie de feijão, também está descrita na indução à hemólise.<sup>68</sup>

A patofisiologia da G6-PD está correlacionada com o tempo de meia-vida da enzima, que em situações fisiológicas é de 62 dias e garante a produção de NADPH para o tempo de meia-vida do eritrócito. O tempo de meia-vida da enzima pode chegar a 13 dias, o que não garante suprimento de NADPH para a meia-vida eritrocitária. Na medida em que a concentração de NADPH diminui, caem também os níveis de GSH e estabelece-se um quadro de estresse oxidativo com consequente

QUADRO 7.10 Classificação da deficiência de G6-PD				
CLASSE	ATIVIDADE G6-PD ERITRÓCITOS	ATIVIDADE G6-PD LEUCÓCITOS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	VARIANTES
I	0%	0%	Anemia hemolítica crônica Infecções de repetição	G6-PD Barcelona G6-PD Clinic
II	0-5%	20-60%	Assintomática Anemia hemolítica aguda <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Medicamentos</li><li>▪ Favismo</li></ul>	Variantes mediterrâneas
III	5-15%	60-90%	Assintomática Anemia hemolítica aguda <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Medicamentos</li><li>▪ Favismo</li></ul>	Variantes africanas e asiáticas
IV	≅ 100%	≅ 100%	Assintomática	G6-PD A+ G6-PD B+
V	> 130%	> 150%	Assintomática	G6-PD Hecktoen



desnaturação da hemoglobina, que forma os corpos de Heinz. O heme é separado da hemoglobina, a cadeia de globina desnatura e esta desnaturação forma os corpos de Heinz, que se unem a grupos sulfidril da membrana eritrocitária, tornando o eritrócito rígido e sem maleabilidade. A consequência desta alteração é a fagocitose pelo sistema mononuclear fagocitário, caracterizando o quadro de hemólise. Os corpos de Heinz formam-se durante os episódios de hemólise e não são revelados pelos corantes hematológicos devendo ser pesquisados por coloração supravital com metilvioleta.

Os pacientes são sintomáticos somente nos episódios de crise de hemólise, e durante estas crises, a hemoglobina pode cair a níveis entre 3 e 4 g/dL.<sup>71</sup> A anemia que se instala é normocítica e normocrômica com policromatofilia, esferócitos e corpos de Heinz. Pode ocorrer hemólise intravascular com presença de hemoglobinúria e hemosiderinúria. O quadro de hemólise inicia entre 2 e 4 dias após a ingestão ou presença do agente oxidante; a reticulocitose está presente após o quinto dia de exposição e atinge o seu pico máximo entre o 7º e o 10º dia.<sup>68</sup> O diagnóstico laboratorial definitivo é a dosagem da enzima G6-PD, porque a presença de corpos de Heinz não é exclusiva dessa deficiência.

#### Deficiência da piruvatoquinase (PK)

É uma doença de herança autossômica recessiva que tem o gene localizado no cromossomo 15 (15q22). A patofisiologia da PK está baseada na diminuição da produção de lactato e piruvato com acúmulo de metabólitos intermediários da via de Embden-Meyerhof, especificamente na degradação anaeróbia da glicose, com diminuição da produção de ATP.<sup>68</sup> A queda na produção de ATP compromete a bomba de sódio e potássio, fazendo com que a célula perca água e potássio resultando em desidratação, alteração da forma e formação de espículas.<sup>68</sup> A perda da maleabilidade determina que a célula seja sequestrada pelo sistema mononuclear fagocitário, o que caracteriza o quadro de hemólise. O heterozigoto é assintomático. No homozigoto, a anemia que se instala é normocítica e normocrômica com concentração de hemoglobina variando entre 6 a 12 g/dL, reticulocitose que pode chegar até 15%, e a extensão sanguínea mostra equinócitos. Não há formação de corpos de Heinz. O diagnóstico laboratorial definitivo é feito pela dosagem da piruvatoquinase.

#### Hemoglobinas instáveis

As hemoglobinas instáveis são de herança autossômica dominante, e os mutantes expressam somente o estado heterozigoto. As mutações alteram os aminoácidos que são os responsáveis pelos pontos de contato entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , modificam o contato entre o heme e a globina e/ou a formação da cadeia de globina. Em qualquer das situações descritas, ocorre uma desnaturação da globina com formação de corpos de Heinz com consequente hemólise. O quadro clínico é bastante variável porque depende da variante que o paciente apresenta, em que já foram descritas mais de 125 variantes de hemoglobina instável. Nas formas mais graves da doença, a hemoglobina está em torno de 7,0 g/dL, com presença de policromatofilia, esquizócitos, esferócitos e ponteados basófilos com pesquisa de corpos de Heinz positiva.

#### Anemias hemolíticas adquiridas

As anemias hemolíticas adquiridas possuem várias etiologias, mas, no geral, o mecanismo de lesão ao eritrócito é extravascular, podendo ser na forma de anticorpos plasmáticos que atuem sobre a membrana eritrocitária, seja pela fragmentação mecânica do eritrócito, ou pela ação de vários agentes, como bactérias, parasitas, calor ou pressão.

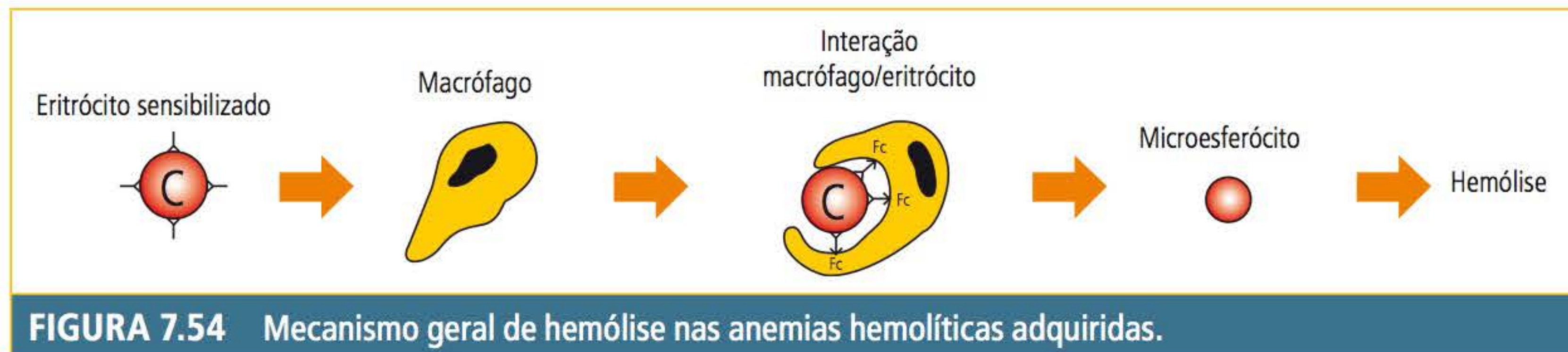
#### Anemias hemolíticas adquiridas com mecanismo imune

As anemias hemolíticas autoimunes são causadas por autoanticorpos. Já nas síndromes hemolíticas em que o antígeno é da mesma espécie do anticorpo, o anticorpo desenvolvido é um isoanticorpo, e as anemias hemolíticas causadas por ele estão relacionadas com a doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) e com as reações hemolíticas transfusionais.<sup>31</sup> Anticorpos podem ser produzidos por alguns fármacos que desenvolvem as chamadas anemias imunomedicamentosas.

#### Anemias hemolíticas autoimunes

A anemia hemolítica autoimune é caracterizada por um desequilíbrio do sistema imune no qual o organismo produz anticorpos (autoanticorpo) contra a membrana eritrocitária (**Figura 7.54**). A origem deste processo pode ser secundária a uma doença de base ou iniciar-se de forma espontânea sem uma causa aparente, o que classifica o evento como idiopático.<sup>112</sup> A gravidade clínica da doença é muito variável e depende do tipo de anticorpo envolvido, de sua concentração plasmática e se possui ou não a capacidade de fixar o complemen-





**FIGURA 7.54** Mecanismo geral de hemólise nas anemias hemolíticas adquiridas.

to (C3b e C4). Os principais anticorpos envolvidos são do tipo IgG, IgM e, mais raramente, o IgA.

Os anticorpos envolvidos nas anemias autoimunes têm sua atividade hemolítica dependente da temperatura, e por isto são classificados em: a) anticorpos quentes, com atividade a 37°C; b) anticorpos frios ou crioaglutininas, que agem em temperaturas que variam entre 0 a 20°C; e c) anticorpos conhecidos como Donath-Landsteiner, que fixam-se à membrana eritrocitária em baixas temperaturas e causam hemólise a 37°C.

- **Autoanticorpos IgG:** São anticorpos quentes com capacidade de fixar complemento (C3b). Nas anemias autoimunes, predominam os subtipos IgG1 e IgG3, que são classificados como anticorpos incompletos por não produzirem aglutinação espontânea dos eritrócitos, necessitando da fixação do complemento. São anticorpos com especificidade anti-Rh. Seu mecanismo de ação consiste em primeiramente opsonizar a membrana eritrocitária para posteriormente ativar o complemento, causando hemólise intravascular aguda, seguida de hemólise extravascular pelo reconhecimento dos eritrócitos pelos macrófagos.<sup>112</sup>
- **Autoanticorpos IgM:** São anticorpos completos que não necessitam da ativação do complemento para a aglutinação dos eritrócitos tanto *in vivo* quanto *in vitro* e que causam hemólise em baixas temperaturas.<sup>112</sup> São comumente chamados de crioaglutininas e, apesar de serem completos, têm sua ação hemolítica baseada na fixação do complemento. São anticorpos com especificidade anti-I e anti-i. A produção de crioaglutininas pode ser um fenômeno súbito, como os anticorpos policlonais produzidos após infecções, como a mononucleose infecciosa (anti-i) ou a infecção por *Mycoplasma* (anti-I). A produção também pode ser crônica quando um clone de linfócitos neoplásicos

produz uma aglutinina fria monoclonal. As características clínicas principais são cianose e isquemia periféricas quando há exposição ao frio.<sup>6</sup>

- **Autoanticorpo IgG de Donath-Landsteiner:** É um anticorpo do tipo IgG frio, porque se une ao eritrócito em baixas temperaturas (< 20°C), porém ativa o complemento em temperatura maiores (37°C). Apresenta-se clinicamente como uma anemia hemolítica intensa com hemoglobinúria com especificidade anti-P.

#### Anemia hemolítica autoimune comum (anticorpos quentes IgG)

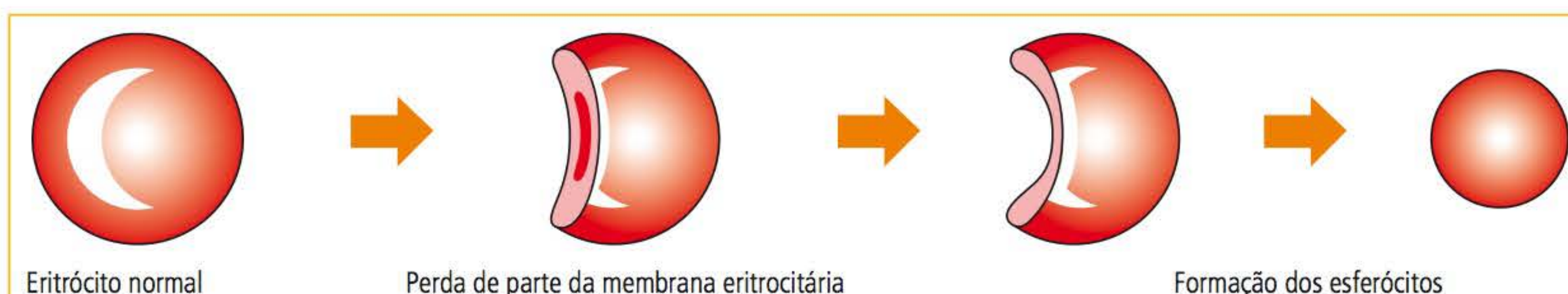
É a forma mais comum de anemia hemolítica autoimune que tem maior frequência em indivíduos adultos acima dos 40 anos de idade. De uma forma geral, metade dos casos é idiopática, sem nenhuma causa aparente, enquanto a outra metade é relacionada com doenças de base e cursa de forma crônica. Entre as patologias que provavelmente estimulam a produção dos autoanticorpos destacam-se as síndromes linfoproliferativas crônicas, como a leucemia linfóide crônica e ou mieloma múltiplo, o lúpus eritematoso, a esclerodermia sistêmica, a artrite reumatoide e a púrpura trombocitopênica idiopática.

Os eritrócitos sensibilizados pelos anticorpos quentes IgG são removidos tanto integralmente quanto em partes pelas células fagocíticas do baço e, em menor grau, do fígado. A remoção de pedaços da membrana leva à formação dos esferócitos (**Figura 7.55**).

#### Características laboratoriais

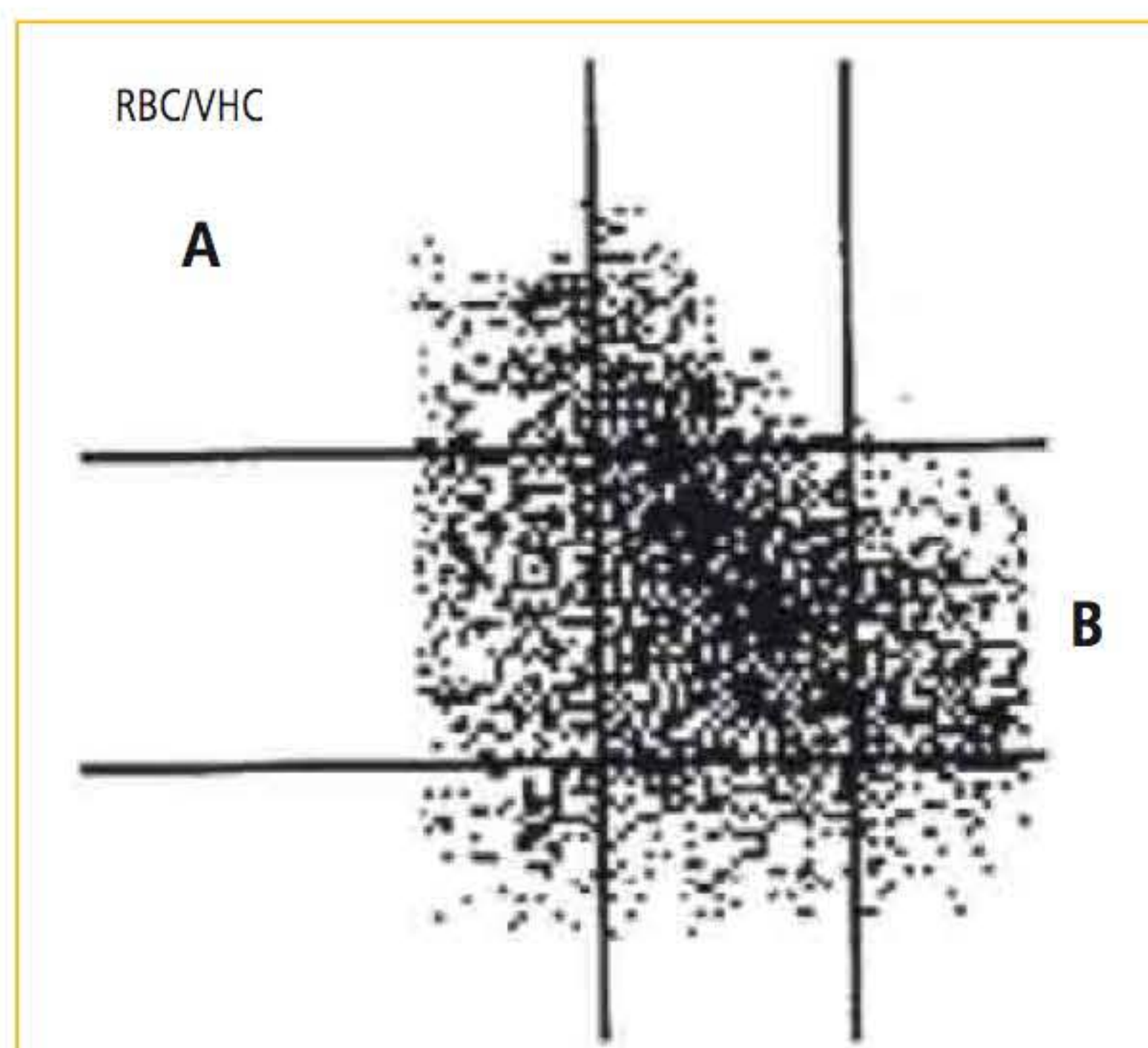
Os valores de hematócrito e hemoglobina variam de acordo com a intensidade do processo hemolítico. O VCM geralmente é macrocítico, refletindo a presença dos reticulócitos. A extensão sanguínea demonstra considerável policromatofilia e anisocitose, além de esferócitos, esquizócitos e, em casos nos quais o estado hemolítico é de longa





**FIGURA 7.55** Formação dos esferócitos nas anemias hemolíticas autoimunes.

duração, podem ser observados dacriócitos.<sup>116</sup> A observação de neutrófilos ou monócitos que fagocitam os eritrócitos tem grande valor diagnóstico. Alguns pacientes apresentam plaquetopenia imune associada, o que é denominado de Síndrome de Evans. Em instrumentos sensíveis às alterações da CHCM, esta constante mostra-se elevada de forma característica (valores acima de 36%). Na linha Advia 120 e 2120, o citograma pode ser muito útil para identificar tanto os reticulócitos (macrócitos hipocrômicos) quanto os esferócitos (hipercrômicos) (**Figura 7.56**).

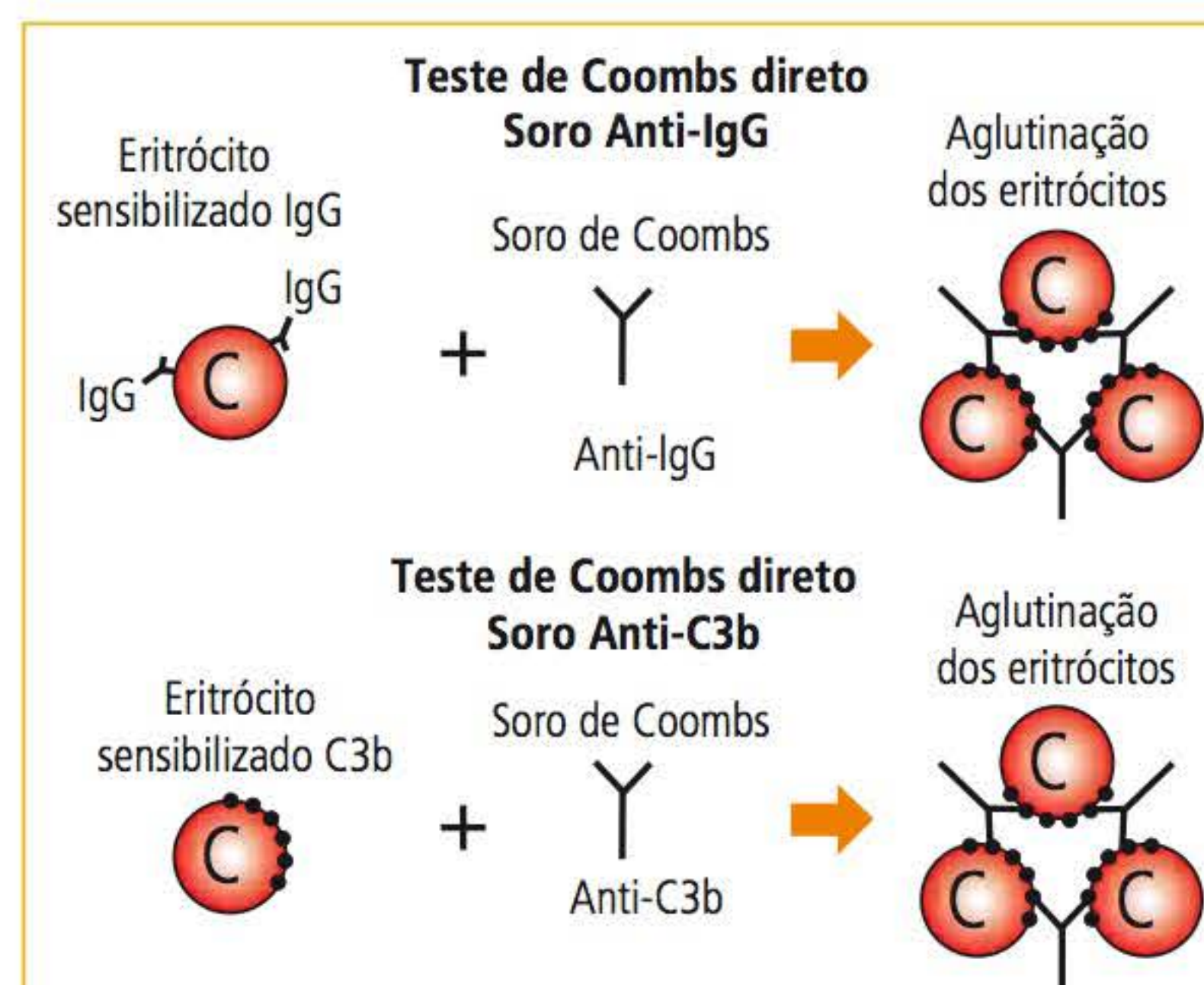


**FIGURA 7.56** Citograma liberado pelos analisadores Advia 120 e 2120. a) eritrócitos hipocrômicos e macrocíticos, provavelmente reticulócitos; b) eritrócitos hipercrômicos, provavelmente esferócitos. Citograma característico da anemia hemolítica autoimune.

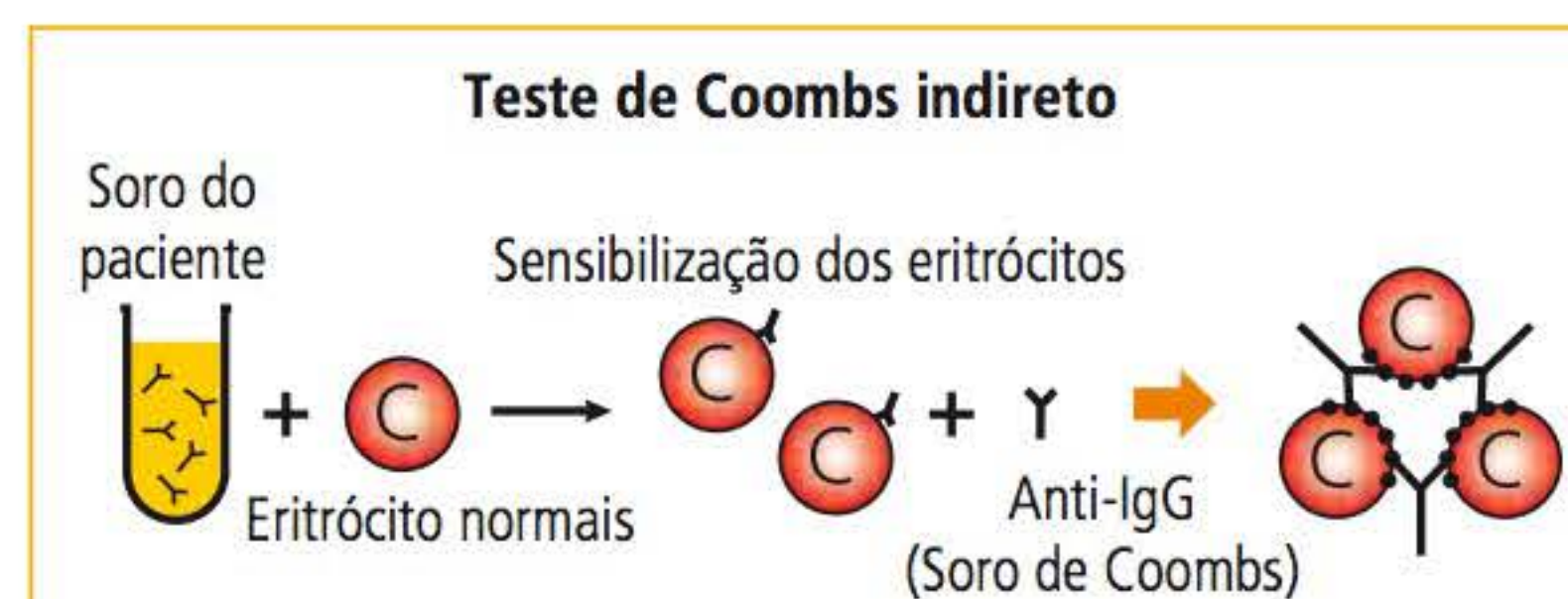
O exame morfológico da medula óssea mostra um padrão de hiper-regeneração eritroide, característico de hemólise e, em casos raros, sinal megaloblástico, pela carência de folato.<sup>112</sup> O nível de bilirrubina indireta apresenta-se moderadamente elevado. Ocasionalmente, são observados hemoglobinemia, hemoglobinúria em pacientes com he-

mólise aguda. A fragilidade osmótica está aumentada em proporção à quantidade de esferócitos.<sup>116</sup>

▪ **Coombs direto e indireto:** A confirmação diagnóstica exige a realização do teste da antiglobulina direta, ou teste de Coombs direto. Este teste consiste em misturar os eritrócitos do paciente com o soro de Coombs (antianticorpos humanos) e observar a presença ou não de aglutinação dos eritrócitos. A presença de autoanticorpos ou a fração do complemento C3b na superfície eritrocitária será detectada pelos antianticorpos presentes no soro de Coombs. A prova de Coombs direta utiliza os eritrócitos do paciente como alvo diagnóstico, enquanto a prova indireta pesquisa a presença de anticorpos no soro do paciente (**Figuras 7.57 e 7.58**).



**FIGURA 7.57** Prova direta de Coombs.



**FIGURA 7.58** Prova indireta de Coombs.



A maior deficiência do teste de Coombs é sua relativa insensibilidade. Reagentes comercializados para uso na rotina laboratorial produzem reações positivas quando no mínimo 300 a 500 anticorpos se ligam à superfície dos eritrócitos. Portanto, em reações hemolíticas pequenas, o teste pode ser negativo.<sup>116</sup> Além disso, o teste direto pode apresentar-se positivo em um a cada 10 mil indivíduos. O uso de sistemas automatizados melhora a sensibilidade do teste, permitindo a observação da reação a partir de 100 anticorpos por eritrócito.<sup>112</sup>

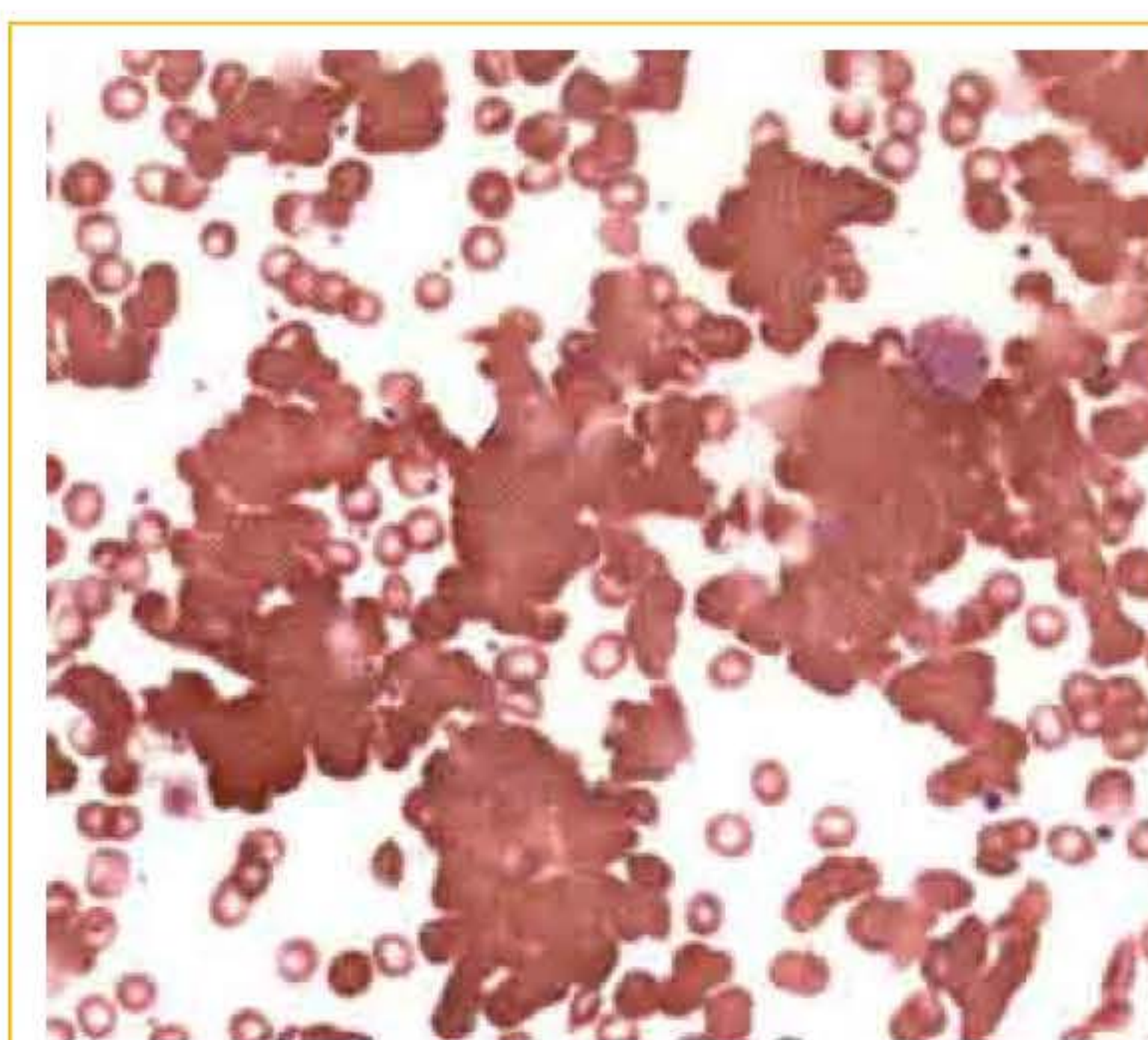
Pela grande quantidade de esferócitos que as anemias hemolíticas autoimunes podem apresentar, o diagnóstico diferencial deve ser feito entre elas e a esferocitose hereditária. Em geral, o teste de Coombs é positivo nas autoimunes e negativo na esferocitose hereditária. A fragilidade osmótica, por estar aumentada nas duas situações, não tem utilidade para a distinção das duas situações.

#### Anemia hemolítica autoimune por crioaglutininas

As anemias hemolíticas autoimunes também podem ser causadas por anticorpos que têm como pico de reação temperaturas abaixo de 37°C e são chamados de anticorpos frios ou crioaglobulinas, geralmente da classe IgM. Essa doença pode ser primária e estar relacionada com a síndrome da crioaglutinina, uma associação de anemia hemolítica com o fenômeno de Raynaud, ou acrocianose. O fenômeno de Raynaud ocorre quando o paciente está exposto ao frio, e nas extremidades (microcirculação) ocorre aglutinação dos eritrócitos, causando isquemia (necrose) e, nos casos mais graves, gangrenas.<sup>68</sup> As partes do corpo mais afetadas são nariz, orelhas e dedos dos pés e das mãos.<sup>68</sup> A doença também pode ser de causa secundária e geralmente ocorre em processos infecciosos (*M. pneumoniae*, mononucleose infecciosa e doenças virais) associada à leucemia linfocítica crônica e a linfomas. A aglutinação eritrocitária ocorre tanto *in vitro* quanto *in vivo* e é reversível com o aumento da temperatura. Pelo fato dessa aglutinação ocorrer *in vitro* devido à queda da temperatura, muitas vezes, a doença é diagnosticada durante a realização do hemograma (**Figura 7.59**).

#### Características laboratoriais

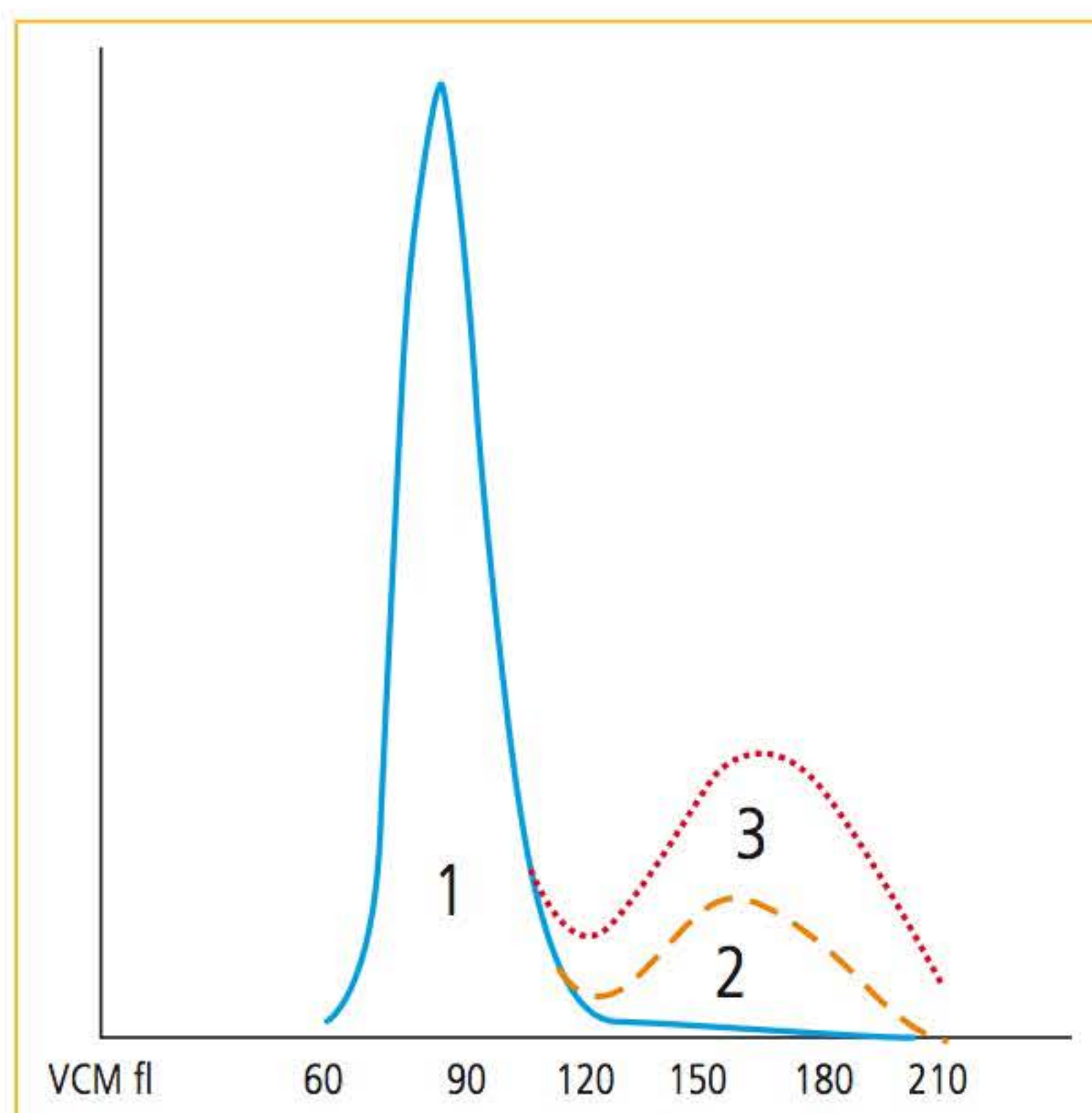
Na anemia hemolítica induzida por crioaglutininas, a extensão sanguínea demonstra aglomerados de eritrócitos, número variável de esferócitos,



**FIGURA 7.59** Aglutinação dos eritrócitos por crioaglutininas.

policromatofilia e macrócitos policromáticos. Quando a mononucleose infecciosa está presente como causa das crioaglutininas, linfócitos atípicos são visualizados na extensão sanguínea. A primeira suspeita da presença de crioaglutininas frequentemente provém de elevações espúrias do VCM, na HCM e na CHCM. Tanto os histogramas (impedância) quanto os citogramas (*laser*) mostram duas populações. O sangue aglutinado forma grumos que são contados pelo aparelho como se fossem um único eritrócito, ocasionando queda do volume globular e aumento do VCM. A dosagem de hemoglobina é normal, sendo o único valor real do eritrograma, e, em função disto, os valores de HCM e CHCM são muito discrepantes. Esta discrepância no eritrograma chama a atenção para um quadro hematológico de crioaglobulina. Se a mesma amostra sanguínea for aquecida à temperatura de 37 °C por um período de 15 minutos, a aglutinação desfaz-se, e os valores do eritrograma passam a ser reais. O quadro hematológico é o mesmo que para a anemia hemolítica autoimune por anticorpos a quente; neste caso, como a hemólise é intravascular, a hemoglobinúria e hemossidenúria podem estar presentes. O teste de Coombs direto é positivo, e o diagnóstico é feito pela pesquisa de crioaglobulinas, crioaglutininas e pelo título de crioaglutininas. A **Figura 7.60** ilustra o comportamento do VCM antes da incubação a 37 °C (curva 3), a 26 °C (curva 2) e após a incubação a 37 °C (curva 1) na presença de crioaglutininas.





**FIGURA 7.60** Comportamento do VCM frente à presença de criaglutininas.

Curva 1, VCM de 85 fL após a incubação a 37 °C; curva 2, VCM de 97 fL obtido a 26 °C; curva 3, VCM de 110 fL obtido a temperatura ambiente.

### Anemias hemolíticas adquiridas causadas por isoanticorpos

#### Doença hemolítica do recém-nascido (DHRN)

A doença hemolítica do recém-nascido constitui uma doença autoimune singular. É caracterizada pela destruição eritrocitária durante a vida fetal e é causada por uma incompatibilidade de grupo sanguíneo materno-fetal. O maior risco de DHRN ocorre na prole de uma mãe Rh-negativa e um pai Rh-positivo. A mãe pode desenvolver um anticorpo (anti-D) que está dirigido contra o antígeno Rh (D) nos eritrócitos de neonatos. Este antígeno é herdado do pai.

A DHRN também pode ser causada por muitos outros antígenos eritrocitários, porém sua frequência é muito menor. A incompatibilidade Rh (Rh-DHRN) é responsável pela maioria dos casos moderados a graves, enquanto na incompatibilidade que ocorre dentro do sistema ABO os sintomas são mais brandos ou subclínicos. Outros anticorpos desenvolvidos contra antígenos eritrocitários, como Duffy, Kell, Kid e o sistema MNS podem estar envolvidos na DHRN.

Várias condições devem ser preenchidas para que a DHRN ocorra; entre elas, as principais são:

1. A mulher deve ter sido exposta, quer por gravidez, quer por transfusão, a um antígeno eritrocitário que ela não tenha;

2. A exposição antigênica deve ser suficiente para causar imunização e produção de anticorpo;
3. O anticorpo deve ter a capacidade de atravessar a placenta e estar em concentração suficiente para gerar a destruição eritrocitária;
4. A criança deve possuir o antígeno correspondente ao anticorpo materno.

Durante a primeira gravidez, não existe incompatibilidade, sendo que o primogênito não é afetado. As nascer, os eritrócitos do feto penetram na circulação materna, à medida que a placenta se separa do útero. Esses eritrócitos podem ser reconhecidos como antigênicos e estimular o sistema imunológico materno a produzir anticorpo específico. Uma vez que a mãe tenha produzido um anticorpo, toda a prole subsequente que herdar o antígeno do pai será afetada. Na próxima gestação com um feto incompatível, o anticorpo materno cruza a placenta e reage com o antígeno no eritrócito fetal. O anticorpo ligado ao eritrócito causa hemólise durante toda a gestação. Os níveis de anticorpo materno no feto atingem os níveis máximos no nascimento.<sup>117</sup> Os anticorpos contra o antígeno D são imunoglobulinas da classe IgG, as quais atravessam a placenta e causam uma reação hemolítica que varia de moderada a grave.

O anticorpo materno fixado ao eritrócito fetal é reconhecido pelo sistema macrofágico do feto, sendo o eritrócito removido, diminuindo sua sobrevivência. A hemólise eritrocitária no recém-nascido provoca anemia e bilirrubinemia, e, indiretamente, leva à hepatomegalia, esplenomegalia e cardiomegalia.

#### Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico se baseia fundamentalmente na positividade do teste direto e indireto de Coombs. Ambas as provas são positivas devido à presença de anticorpos tanto na superfície eritrocitária quanto no plasma do indivíduo afetado.<sup>112</sup> A anemia estabelece-se porque há um aumento da destruição eritrocitária pelo sistema mononuclear fagocitário devido ao anticorpo ligado à membrana eritrocitária. Os valores da hemoglobina começam a cair nas primeiras 24 horas de vida, e a hemólise continuará até que todo o anticorpo presente seja retirado da corrente circulatória. As IgG têm um tempo de meia-vida de aproximadamente três semanas.<sup>32</sup> O grau de anemia é propor-



cional à intensidade de hemólise, que se caracteriza por ser extravascular com formação de grandes quantidades de bilirrubina indireta. O recém-nascido (RN) apresenta uma baixa atividade enzimática para conjugar a bilirrubina indireta que se deposita nos tecidos, o que caracteriza o sintoma clínico de icterícia. A deposição de bilirrubina no cérebro pode levar (dependendo da concentração de bilirrubina indireta) a uma encefalopatia conhecida como *kernicterus*. Durante a vida intrauterina, a bilirrubina é transportada por meio da placenta e eliminada via circulação materna, mas, após o nascimento, ela acumula-se no RN.

O RN apresenta uma macrocitose fisiológica e, nessa anemia, devido à presença de grandes quantidades de reticulócitos, a macrocitose pode tornar-se mais intensa. Pela intensa atividade da medula óssea em razão do processo hemolítico, pode ser liberado para o sangue grande número de eritroblastos (eventualmente, podem ser observados até pró-eritroblastos); por este motivo, chamava-se este quadro hemolítico de eritroblastose fetal.<sup>31</sup>

#### ▪ DHRN por incompatibilidade do sistema

**ABO:** Na imunização pelo grupo sanguíneo ABO, os anticorpos que predominam são da classe IgM, que causam uma anemia hemolítica na maioria das vezes discreta ou moderada, mas podendo ser grave. Esses anticorpos não atravessam a placenta, mas podem ser formadas pequenas quantidades de anticorpos da classe IgG, que cruzam a placenta e podem levar à reação hemolítica grave.<sup>31</sup> A incompatibilidade pelo sistema sanguíneo ABO é caracterizada por uma reação hemolítica transfusional imediata porque o sistema ABO caracteriza-se por ter anticorpos naturais. Quando o eritrócito incompatível está presente na circulação, a reação antígeno-anticorpo é imediata porque ocorre a ativação do sistema complemento com consequente lise eritrocitária; os anticorpos do tipo IgM ou IgG, com especificidade ABO, são ativadores do complemento especificamente da via clássica.<sup>68</sup> Quando o anticorpo não está presente no plasma, a reação hemolítica ocorre posteriormente, em um período que pode variar entre 2 a 14 dias, porque o anticorpo vai ser produzido no baço após este reconhecer o antígeno não próprio. A maioria

dessas reações está associada ao sistema Rh, Kell e Duffy e são reações transfusionais chamadas de retardadas ou tardias. As alterações na extensão sanguínea são as mesmas características de quadros hemolíticos intra e extravasculares.<sup>31</sup>

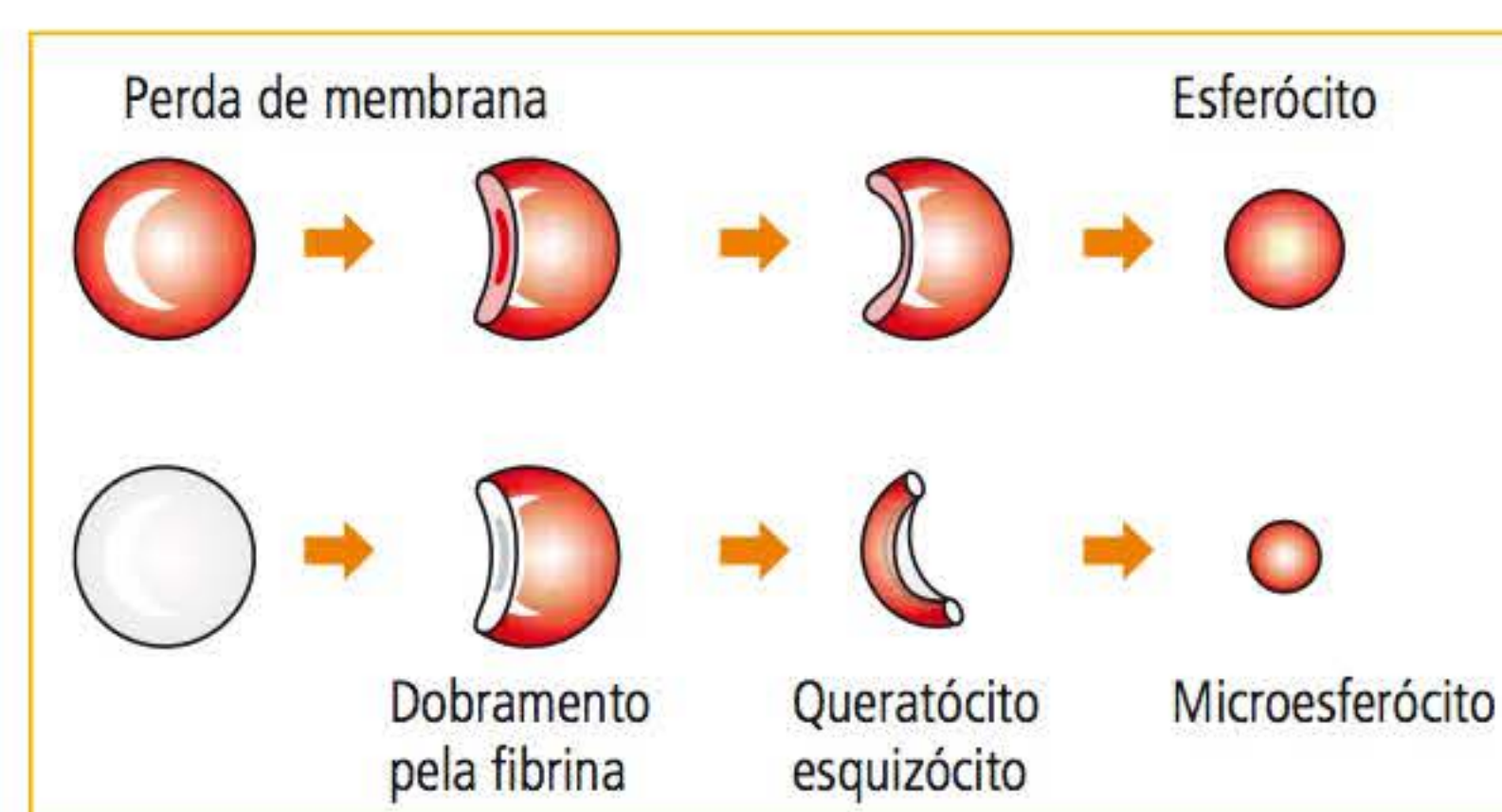
#### Anemias hemolíticas extracorpóricas não imunes

São menos frequentes que as anemias hemolíticas de origem imune e são distinguidas destas pela negatividade da prova direta de Coombs. Todas as anemias deste grupo apresentam como característica a agressão externa ao eritrócito. As principais causas estão correlacionadas a microangiopatias e a efeitos mecânicos. Agentes como bactérias, parasitas ou distúrbios metabólicos também podem causar esse tipo de anemia.

#### Hemólise por fragmentação mecânica intravascular

Mesmo com a sua impressionante capacidade de deformação, em determinadas circunstâncias, lesões no sistema vascular podem alterar a dinâmica circulatória que produz a fragmentação mecânica do eritrócito. As principais causas de lesão mecânica podem ser classificadas em dois grupos: (1) lesões do coração e de grandes vasos; e (2) lesões de pequenos vasos ou de microcirculação.

Nestas condições, observa-se uma intensa alteração na morfologia eritrocitária, com destaque para a presença de esquizócitos, queratócitos e microesferócitos, que são rapidamente eliminados pelo sistema macrofágico. Este tipo de fragmentação mecânica é também observado na SHU e na PTT. A **Figura 7.61** ilustra o mecanismo de formação dos microesferócitos, queratócitos e esquizócitos pela fragmentação mecânica.



**FIGURA 7.61** Mecanismo de fragmentação mecânica que forma os queratócitos, esquizócitos e microesferócitos.



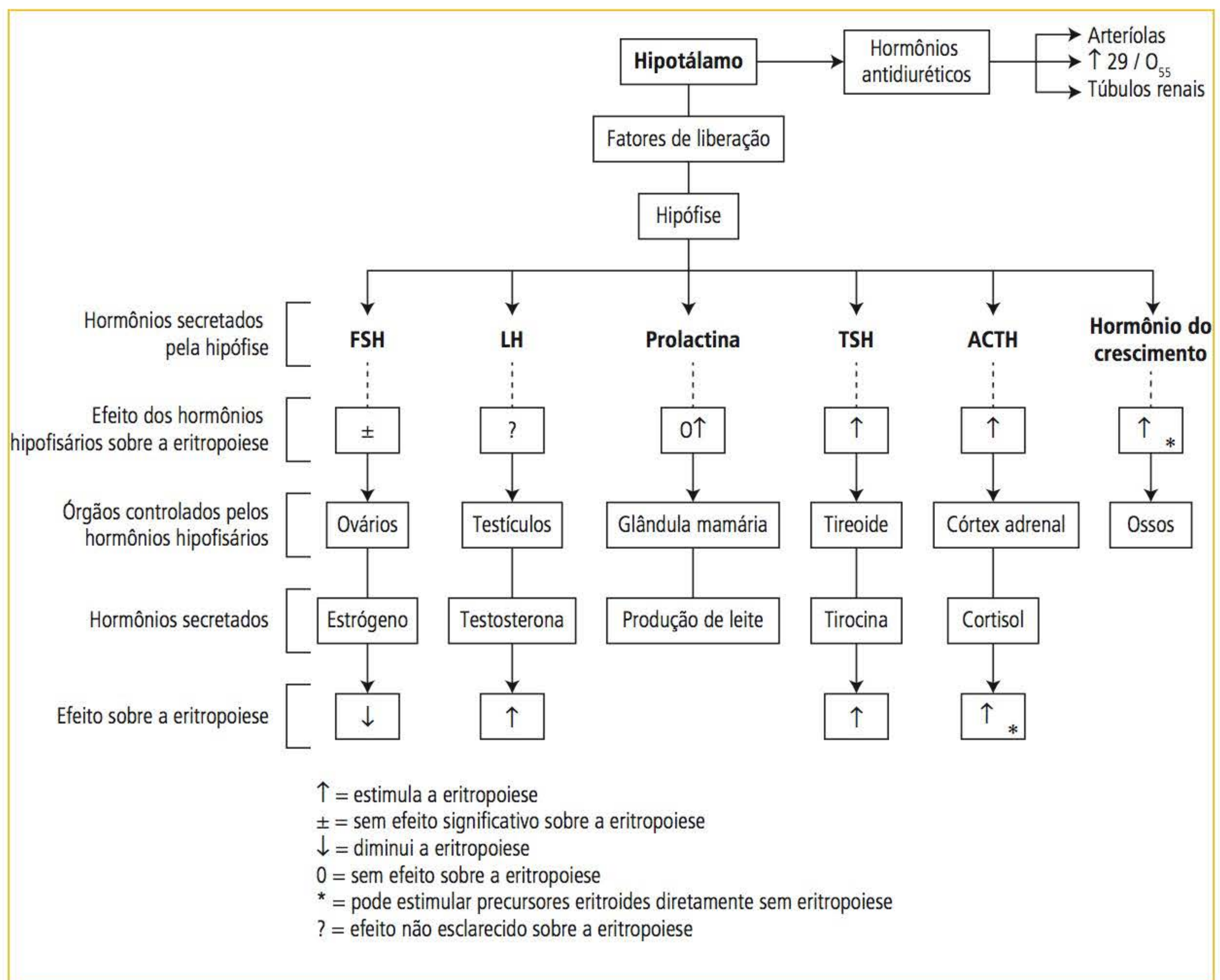
## ANEMIAS NORMOCÍTICAS E NORMOCRÔMICAS NÃO HEMOLÍTICAS

### Doenças hormonais

Os hormônios produzidos pelo nosso organismo exercem uma ação sobre a eritropoiese que está demonstrada na **Figura 7.62**.

A incidência de anemia nas doenças endócrinas é baixa e, quando se instala, é de intensidade moderada e com morfologia pouco alterada, e não há alteração da série branca e plaquetária.<sup>32</sup> No hipotireoidismo, em torno de 21 a 60% dos pacientes apresentam anemia e esta é devida à redução da produção celular e à diminuição da necessidade de oxigenação do organismo. A anemia caracteriza-se por ser uma adaptação fisiológica em que o organismo se adapta à redução das necessidades de oxigênio.<sup>32</sup> A anemia é normocítica e normocrômica podendo apresentar uma macrocitose discreta, a hemoglobina raramente está abaixo de 8 ou 9,0 g/dL e um achado morfológico

é a presença de acantócitos em 20% dos pacientes. Pode haver a instalação de uma anemia megaloblástica por deficiência de fator intrínseco pelo desenvolvimento de um anticorpo contra fator intrínseco ou contra células parietais; esses anticorpos são desenvolvidos por mecanismo autoimune. A gravidade da anemia é proporcional ao déficit de vitamina B<sub>12</sub>. Também pode ser instalada uma anemia microcítica e hipocrômica por deficiência de ferro, que na mulher ocorre pelo quadro de menorragia e, no homem, por acloridria (ver tópico Ferro no Capítulo 5, Eritropoiese e metabolismo energético do eritrócito). No hipertireoidismo, a anemia estabelece-se por uma eritropoiese ineficaz aumentada; o VCM pode estar normal ou microcítico.<sup>32</sup> A anemia afeta entre 10 a 25% dos pacientes e está presente nas formas mais graves e prolongadas da doença. A doença de Addison é um hipoadrenalismo em que há diminuição da produção do cortisol, e esta é a causa da anemia.<sup>32</sup> No hipogonadismo, por redu-



**FIGURA 7.62** Ação dos hormônios sobre a eritropoiese.



ção da produção de testosterona, há uma diminuição da concentração de hemoglobina.<sup>32</sup> As anemias presentes na doença endócrina não vão responder a tratamentos que visem à correção da anemia, que ocorrerá quando a produção hormonal retornar aos níveis normais.<sup>32</sup>

Insuficiência renal crônica

Na insuficiência renal crônica, a anemia instala-se pelo déficit da produção de eritropoietina, e a intensidade da anemia é proporcional ao comprometimento renal. É uma anemia por falta de estímulo à eritropoiese e se caracteriza por ser normocítica e normocrômica com alterações morfológicas discretas, com predomínio de equinócitos.<sup>32</sup> A anemia é consequência da perda da produção da eritropoietina devido à falência renal, que também causa retenção de líquidos com aumento do volume plasmático.<sup>32</sup> A anemia é absoluta pela deficiência de eritropoietina e relativa pelo aumento do volume plasmático. Pelo aumento da concentração de ureia, há uma diminuição da sobrevida eritrocitária. A combinação dos fatores, diminuição na produção de eritropoietina, aumento do volume plasmático e diminuição da sobrevida eritrocitária leva à anemia.<sup>32</sup> É uma anemia de instalação lenta, que permite uma adaptação fisiológica à redução da hemoglobina. Na medida em que a insuficiência renal progride, a produção da eritropoietina e o estímulo à eritropoiese diminuem, e o paciente vai se adaptando a níveis cada vez menores de hemoglobina, que podem chegar a valores abaixo de 5,0 g/dL.<sup>32</sup> Quanto maior for a concentração de creatinina, menor será a concentração da hemoglobina e mais grave será a anemia.<sup>32</sup>

Anemia das doenças hepáticas

O álcool é causa comum de hematossupressão. A ingestão habitual do álcool leva a um declínio da celularidade da medula óssea, e 40 a 96% dessas pessoas apresentam macrocitose, sendo que a maioria não tem anemia.<sup>32</sup> Quando a anemia está presente, ela é moderada, e a hemoglobina geralmente está acima de 7 a 8 g/dL. Além da anemia, pode ocorrer uma neutropenia moderada e uma trombocitopenia que varia de moderada a grave.<sup>32</sup> Este é um quadro de anemia hepática não complicada por ação do álcool que é reversível na abstinência alcoólica.<sup>32</sup> No alcoolismo crônico acompanhado de cirrose hepática, pode-se instalar uma deficiência de folato levando à anemia

megaloblástica.<sup>32</sup> O álcool também inibe várias enzimas da via metabólica do heme, como porfobilinogênio sintetase, uroporfirinogênio descarboxilase, coproporfirinogênio oxidase e heme sintetase. Afeta também a função da mitocôndria, o efeito sobre a síntese do heme, e a função mitocondrial leva à anemia sideroblástica.<sup>32</sup>

Anemias por falência da medula óssea

A anemia aplástica é caracterizada por uma pancitopenia, ou seja, a diminuição das três linhagens celulares: eritrócitos, leucócitos e plaquetas.<sup>32</sup> A medula óssea mostra-se hipoplástica ou aplástica. A classificação das anemias aplásticas está descrita no **Quadro 7.12**.

QUADRO 7.12 Classificação das anemias aplásticas
ANEMIAS APLÁSTICAS ADQUIRIDAS
<b>Induzidas por agentes químicos e físicos</b> <b>a. Hipoplasia regular</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Benzeno e seus derivados</li><li>▪ Radiações ionizantes</li><li>▪ Agentes antimetabólitos</li><li>▪ Antimicóticos</li><li>▪ Antibióticos (daunorubicina, adriamicina, cloranfenicol, arsênicos, estrógenos e quinacrina)</li></ul> <b>b. Hipoplasia ocasional</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Estreptomicina, penicilina, meticilina, oxitetraciclina, sulfonamidas, anfotericina B, metilfenilhidantoína, difenilhidantoína, etosisuximida, metilmeraptoimidazol, perclorato de potássio, tolbutamida, clorpropamida, ácido acetilsalicílico, indometacina, carbamazepina, clorpromazina, promazina, inseticidas, corantes para cabelo, dinitrofenol, tiocianato, bismuto, tetracloreto de carbono, solventes, cimetidina e baixas doses de metotraxate</li></ul> <b>c. Outros agentes</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Infecções virais (hepatite, Epstein Barr, HIV e dengue) e infecções causadas por micobactérias</li></ul> <b>d. Idiopáticas</b>
ANEMIAS APLÁSTICAS CONGÊNITAS
▪ Anemia de Fanconi

A grande maioria das anemias aplásticas é idiopática.<sup>32</sup> Os mecanismos que levam à aplasia incluem deficiência, imunossupressão ou defeito nas células-tronco da medula óssea. Estas condições determinam que as células-tronco não respondam aos fatores de crescimento.<sup>32</sup> A anemia que se instala é normocítica e normocrômica; algumas vezes, macrocítica e sem alterações morfológicas intensas. A gravidade da anemia é proporcional à diminuição das células na medula óssea. Sempre que o hemograma mostrar um quadro de bicitopenia (anemia e leucopenia, anemia e trom-



bocitopenia e leucopenia e trombocitopenia) persistente, deve-se pensar em problemas com a produção celular na medula óssea.<sup>32</sup>

### Meta-hemoglobinemias

As alterações funcionais do grupo heme de maior interesse na hematologia consistem principalmente na incapacidade do eritrócito em manter reduzido o átomo de ferro. Durante a vida média dos eritrócitos, há uma exposição a vários agentes endógenos e exógenos que são capazes de oxidar a hemoglobina. Na ausência de um sistema enzimático eficiente para a redução da meta-hemoglobina, ocorre um acúmulo deste pigmento em níveis diários de 2 a 3%; porém, quando esses sistemas são eficientes, os eritrócitos humanos acumulam menos que 0,6% de meta-hemoglobina.<sup>118</sup>

A meta-hemoglobina é um derivado da hemoglobina no qual o íon ferro está na sua forma oxidada ( $\text{Fe}^{+3}$ ).<sup>119</sup> A formação espontânea da meta-hemoglobina é normalmente neutralizada por sistemas de proteção enzimáticos, sendo que sua via de redução mais importante utiliza a catalisação do NADPH pela citocromo-b5-redutase para a transferência de um elétron de NADPH para o heme. Outro mecanismo para redução da meta-hemoglobina envolve a transferência direta do ácido ascórbico e glutatona para o grupamento heme.<sup>68</sup> Apesar dos mecanismos existentes para reduzir a meta-hemoglobina, apenas a reação dependente de NADPH catalisada pela citocromo-b5-redutase é fisiologicamente importante.<sup>119</sup>

O excesso de meta-hemoglobina ocorre quando o ferro do grupamento heme é oxidado para a forma férrica em uma velocidade superior à redução do ferro para a forma ferrosa, caracterizando o estado de meta-hemoglobinemia. As principais causas do aumento da meta-hemoglobina podem estar relacionadas à deficiência de enzimas eritrocitárias específicas para as atividades redutoras da oxidação do ferro do grupo heme, à indução oxidativa da hemoglobina por compostos químicos oxidantes e aos defeitos moleculares na hemoglobina, o que causa contínua auto-oxidação.<sup>80</sup> As hemoglobinas instáveis também são causa de cianose, como a Hb Zurich ( $\beta 63\text{His} \rightarrow \text{Arg}$ ), Hamersmith ( $\beta 42\text{Phe} \rightarrow \text{Ser}$ ) e Freiburg ( $\beta 23\text{Val} \rightarrow 0$ ).

A rapidez da produção da meta-hemoglobina por agentes exógenos depende de vários fatores, como a quantidade do composto que entra na circulação, o metabolismo destes compostos no or-

ganismo, a extensão com que o composto é convertido em formas intermediárias com alto potencial oxidante, a excreção do composto e a taxa com que os eritrócitos conseguem reduzir a meta-hemoglobina em hemoglobina. Vários compostos químicos utilizados em casa ou na indústria e vários agentes terapêuticos são capazes de aumentar a taxa de oxidação do heme em até 1.000 vezes, ultrapassando, portanto, a capacidade dos eritrócitos de manter a hemoglobina no estado reduzido.

A meta-hemoglobinemia também pode ser de causa genética. A mais comum é a deficiência da enzima citocromo-b5-redutase; na sua ausência, a concentração de meta-hemoglobina pode chegar a valores acima de 40%.<sup>119</sup> Outra causa genética rara são as hemoglobinas mutantes, conhecidas como hemoglobina M, que são caracterizadas por uma permanência do ferro no estado oxidado.<sup>112</sup> Várias hemoglobinas anormais, coletivamente denominadas de hemoglobinas M, têm sido descritas. Na maioria delas, a anormalidade genética acontece pela substituição das histidinas proximal e distal pela tirosina. Destas, a hemoglobina M Boston é a mais comum, sendo descrita em vários países, inclusive no Brasil.<sup>75</sup>

Deve-se suspeitar de meta-hemoglobinemia em todo paciente com cianose inexplicada.<sup>120</sup> Nos quadros de intoxicação aguda, como consequência da ingestão de drogas ou exposição tóxica, além da cianose, o paciente apresenta os sintomas clínicos de anemia.<sup>57</sup>

A avaliação da meta-hemoglobina é um importante marcador biológico de processos oxidativos, porém sua determinação é pouco solicitada na rotina laboratorial. Este fato pode ser explicado pelo desconhecimento do quadro hematológico de meta-hemoglobinemia como, também, por fatores técnicos.<sup>80</sup> A técnica proposta por Evelyn e Maloy,<sup>81</sup> em 1938, utiliza compostos químicos altamente tóxicos, o que desencoraja sua utilização. Os métodos enzimáticos possuem um custo elevado, o que dificulta a realização da dosagem na rotina laboratorial.<sup>80</sup>

Com a publicação por Naoum<sup>63</sup> de um teste quantitativo de meta-hemoglobina por meio da absorção espectrofotométrica e sem a utilização de compostos tóxicos, abriu-se uma nova perspectiva para o diagnóstico da meta-hemoglobinemia. Os valores de referência para uma população normal adulta, por esta técnica, variam entre 1,9 a



3,8%. Rechetzki e colaboradores,<sup>82</sup> utilizando a mesma técnica, encontraram valores de normalidade mais altos para crianças entre 6 a 10 anos (3,61 a 6,44%). O aumento da concentração da meta-hemoglobina em crianças pode ser explicado pela menor quantidade do cofator citocromo b5 solúvel e pela atividade diminuída da citocromo b5-redutase nos eritrócitos, o que torna a população infantil particularmente suscetível ao desenvolvimento de meta-hemoglobinemias.<sup>82</sup>

### Eritrocitoses

As eritrocitoses podem ser divididas em primárias e secundárias. As primárias são doenças clonais em que uma célula-tronco hematopoietica é transformada e acarreta um aumento da massa eritrocitária acompanhada de leucocitose com neutrofilia e trombocitose, quadro clínico conhecido como policitemia vera (PV). Nas eritrocitoses secundárias (não clonais), ocorre somente aumento da massa eritrocitária e são reativas à produção da eritropoietina.

O termo policitemia, ao contrário de pancitopenia, significa o aumento das três linhagens da série mieloide: eritrocitose, leucocitose à custa de neutrofilia e trombocitose. A PV é uma doença mieloproliferativa que pode ser definida como um defeito adquirido em uma célula-tronco multipotencial que se manifesta com uma produção excessiva de eritrócitos aparentemente normais, com uma variada hiperprodução de leucócitos e plaquetas,<sup>51</sup> esplenomegalia,<sup>52</sup> complicações trombohemorrágicas,<sup>52</sup> que pode evoluir para um quadro de leucemia mieloide aguda ou metaplasia mieloide.<sup>52</sup>

O gene Janus quinase 2 (JAK2), localizado no cromossomo 9q,<sup>35</sup> é uma tirosinoquinase que é ativada quando a eritropoietina se liga ao seu receptor na célula eritroide. A mudança conformacional no receptor ativa (fosforilação) a proteína JAK2, e as células eritroides proliferam.<sup>51</sup> A base molecular da PV é uma mutação pontual no gene JAK2 na posição 1849, na qual ocorre a troca de uma guanina (G) por uma timina (T) (1849G→T), ocasionando a troca de uma valina (V) pela fenilalanina (F) no aminoácido na posição 617 da proteína JAK2; a mutação foi descrita pela sigla JAK2V617F.<sup>51</sup> Atualmente, o critério diagnóstico da PV, segundo a Organização Mundial de Saúde, é a presença da mutação JAK2V617F.<sup>50</sup> A incidência de alterações cromossômicas na PV é rara, mas estão descritas trissomias dos cromossomos 8 e 9,

deleção do cromossomo Y e inversão do 11 detectadas pela citogenética convencional e pela hibridização *in situ* (FISH).<sup>49</sup>

O diagnóstico clínico da PV é feito quando o paciente apresenta eritrocitose, leucocitose, trombocitose e esplenomegalia. Na suspeita clínica de PV, a dosagem de eritropoietina (EPO) e a prova citoquímica para fosfatase alcalina devem ser feitas. O resultado esperado é uma concentração baixa de EPO e um escore alto para a fosfatase alcalina.<sup>52</sup> O mielograma é indicado e mostra hiper celularidade e alterações numéricas e morfológicas dos megacariócitos.<sup>52</sup> A citogenética também é recomendada porque alterações cromossômicas são observadas em torno de 13 a 18% dos casos de PV.<sup>52</sup> O *screening* para as mutações JAK2V617F e bcr-abl devem ser feitas; a primeira deve estar positiva e a segunda, negativa.<sup>52</sup>

A PV é de início insidioso, se manifesta após os 60 anos de idade, e os principais sintomas são dor de cabeça, prurido, trombose, sangramento gastrointestinal e, muitas vezes, o diagnóstico é feito por hemograma de rotina, pela observação de eritrocitose, leucocitose e trombocitose.<sup>35</sup> A principal complicação desses pacientes são os eventos trombóticos, manifestados como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, trombose venosa profunda e embolia pulmonar.<sup>35</sup>

Na série vermelha, o eritrograma mostra elevação do número de eritrócitos, aumento da concentração da hemoglobina e volume globular. Um volume globular acima de 55% em homens e 47% em mulheres é indicativo de policitemia.<sup>68</sup> Os pacientes com PV apresentam uma diminuição do ferro sérico e dos estoques de ferro (ferritina). Isto ocorre porque a massa eritrocitária produzida é muito grande, levando ao esgotamento das reservas de ferro, e também pelo sangramento gastrointestinal que os pacientes apresentam. O quadro hematológico que se estabelece é de um aumento das contagens e determinações eritrocitárias acompanhadas de microcitose e hipocromia. A anisopoiquilocitose é intensa com presença marcante de dacriócitos.<sup>35</sup> A pO<sub>2</sub> arterial é baixa, muitas vezes com níveis abaixo de 63 mmHg com consequente queda da saturação de O<sub>2</sub>.<sup>35</sup> A série branca mostra leucocitose à custa de neutrofilia com presença de mielócitos, metamielócitos e basofilia. O escore para a fosfatase alcalina está elevado, mostrando ativação de neutrófilos. A contagem de plaquetas está aumentada, ao diagnóstico,



em metade dos pacientes.<sup>35</sup> Cerca de 10% dos pacientes apresentam contagens acima de 1.000.000 de plaquetas/ $\mu$ L.<sup>35</sup> Muitas vezes, no início da PV, o paciente apresenta trombocitose isolada.<sup>7</sup>

A eritrocitose secundária é reacional à produção de EPO e pode ocorrer em indivíduos que estão em grandes altitudes, pacientes com enfisema pulmonar, fumantes e com tumores renais. Nas eritrocitoses secundárias, somente a série vermelha está alterada; as demais (leucócitos e plaquetas) não.

## REFERÊNCIAS

1. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002;48(7):1066-76.
2. Vives Corrons JL. Introduccion al estudio de la patología eritrocitaria: bases bioquímicas y fisiológicas. In: Sans-Sabrafen J, organizador. *Hematologia clinica*. 3. ed. Madrid: Mosby; 1994.
3. Bothwell TH. The diagnosis of iron deficiency. *NZMedJ*. 1966;880-3.
4. Jacob RA, Sandstead HH, Klevay LM, Johnson LK. Utility of serum ferritin as a measure of iron deficiency in normal males undergoing repetitive phlebotomy. *Blood*. 1980;56(5):786-91.
5. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*. 1997;89(3):1052-7.
6. Bain JB. Valores de referência. In: Bain JB. *Células sangüíneas: um guia prático*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
7. Jolobe OM. Prevalence of hypochromia (without microcytosis) vs microcytosis (without hypochromia) in iron deficiency. *Clin Lab Haematol*. 2000;22(2):79-80.
8. Chuang CL, Liu RS, Wei YH, Huang TP, Tarng DC. Early prediction of response to intravenous iron supplementation by reticulocyte haemoglobin content and high-fluorescence reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(2):370-7.
9. Macdougall IC, Cavill I, Hulme B, Bain B, McGregor E, McKay P, et al. Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. *BMJ*. 1992;304(6821):225-6.
10. Bovy C, Tsobo C, Crapanzano L, Rorive G, Beguin Y, Albert A, et al. Factors determining the percentage of hypochromic red blood cells in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;56(3):1113-9.
11. d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, Mancini S, Mango G. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med*. 1992;116(1):84-9.
12. Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Médica Paulista; 2007.
13. Fishbane S, Galgano C, Langley RC Jr, Canfield W, Maesaka JK. Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1997;52(1):217-22.
14. Burns ER, Goldberg SN, Lawrence C, Wenz B. Clinical utility of serum tests for iron deficiency in hospitalized patients. *Am J Clin Pathol*. 1990;93(2):240-5.
15. Jain S, Narayan S, Chandra J, Sharma S, Malhan P. Evaluation of serum transferrin receptor and sTfR Ferritin indices in diagnosing and differentiating iron deficiency anemia from anemia of chronic disease. *Indian J Pediatr*. 2010;77(2):179-83.
16. Paiva AA, Rondó PHC, Guerra-Shinohara EM. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. *Rev Saúde Pública*. 2000;34(4):421-6.
17. Fairbanks VF, Klee GG. Aspectos bioquímicos da hematologia. In: Koogan EG, editor. *Tietz: fundamentos de química clínica*. 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 1998.
18. Tietz NW, Rinker AD, Morrison SR. When is a serum iron really a serum iron? The status of serum iron measurements. *Clin Chem*. 1994;40:546-51.
19. Bainton DF, Finch CA. The diagnosis of iron deficiency anemia. *Am J Med*. 1964;37:62-70.
20. Sheridan BL, Pearce LC. Serum tests to detect iron deficiency. *Clin Chem*. 1984;30(7):1271.
21. Skikne BS. Serum transferrin receptor. *Am J Hematol*. 2008;83(11):872-4.
22. Kohgo Y, Niitsu Y, Kondo H, Kato J, Tsushima N, Sasaki K, et al. Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood*. 1987;70(6):1955-8.
23. Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum transferrin receptor. *Annu Rev Med*. 1993;44:63-74.
24. Cazzola M, Beguin Y. New tools for clinical evaluation of erythron function in man. *Br J Haematol*. 1992;80(3):278-84.
25. Means RT. Anemias Secondary to chronic disease and systemic disorders. In: Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, et al., editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 12th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2009.
26. Joosten E, Van Loon R, Billen J, Blanckaert N, Fabri R, Pelmans W. Serum transferrin receptor in the evaluation of the iron status in elderly hospitalized patients with anemia. *Am J Hematol*. 2002;69(1):1-6.
27. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irjala K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood*. 1998;92(8):2934-9.
28. Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A, Neeis H, et al. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(1):69-73.
29. Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Traubio E, et al. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol*. 2001;115(1):100-11.
30. Cançado RD, Chiatone CS. Anemia de doença crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24(2):127-36.
31. Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do eritrograma. São Paulo: Lovise; 1999.
32. Galiza Neto G, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;39(1):51-6.
33. Thorbecke GJ, Liem HH, Knight S, Cox K, Muller-Eberhard U. Sites of formation of the serum proteins transferrin and hemopexin. *J Clin Invest*. 1973;52(3):725-31.
34. Chang CC, Kass L. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol*. 1997;108(1):69-73.



35. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*. 1988;242(4884):1412-5.
36. Thomas L, Franck S, Messinger M, Linssen J, Thome M, Thomas C. Reticulocyte hemoglobin measurement--comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1193-202.
37. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA*. 1999;281(23):2225-30.
38. Garzia M, Di Mario A, Ferraro E, Tazza L, Rossi E, Luciani G, et al. Reticulocyte hemoglobin equivalent: an indicator of reduced iron availability in chronic kidney diseases during erythropoietin therapy. *Lab Hematol*. 2007;13(1):6-11.
39. Bovy C, Gothot A, Krzesinski JM, Beguin Y. Mature erythrocyte indices: new markers of iron availability. *Haematologica*. 2005;90(4):549-51.
40. d'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, Caenaro G, Tommasi M, Micciulli G. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood*. 1995;85(3):818-23.
41. Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(10):1369-80.
42. Canals C, Remacha AF, Sarda MP, Piazuelo JM, Royo MT, Romero MA. Clinical utility of the new Sysmex XE 2100 parameter - reticulocyte hemoglobin equivalent - in the diagnosis of anemia. *Haematologica*. 2005;90(8):1133-4.
43. Bothwell TH. The diagnosis of iron deficiency. *NZ Med J*. 1966;880-3.
44. Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Médica Paulista; 2007.
45. Eldibany MM, Totonchi KF, Joseph NJ, Rhone D. Usefulness of certain red blood cell indices in diagnosing and differentiating thalassemia trait from iron-deficiency anemia. *Am J Clin Pathol*. 1999;111(5):676-82.
46. Bessman JD, Feinstein DI. Quantitative anisocytosis as a discriminant between iron deficiency and thalassemia minor. *Blood*. 1979;53(2):288-93.
47. Melo MR, Purini MC, Cançado RD, Kooro F, Chiattoni CS. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada? *Rev Assoc Méd Bras*. 2002;48(3):222-4.
48. Lima CS, Reis AR, Grotto HZ, Saad ST, Costa FF. Comparison of red cell distribution width and a red cell discriminant function incorporating volume dispersion for distinguishing iron deficiency from beta thalassemia trait in patients with microcytosis. *Sao Paulo Med J*. 1996;114(5):1265-9.
49. Henneberg R, Leite AA, Nascimento AJ. Characterization erythrocytary differentiation among iron deficiency, heterozygous sickle disease and beta thalassemia minor. *Visão Acadêmica*. 2008;9(2):55-64.
50. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific; 1981.
51. Lukens JN. Hemoglobinopatias S,C,D,E & O e doenças associadas. In: Lee RG, Bitchell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, organizadores. *Wintrobe: hematologia clínica*. 9. ed. São Paulo: Manole; 1998.
52. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) Allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000;151(9):839-45.
53. Belisário AR, Martins ML, Brito AM, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB.  $\beta$ -Globin Gene Cluster Haplotypes in a Cohort of 221 Children with Sickle Cell Anemia or  $\beta\beta$ -Thalassemia and Their Association with Clinical and Hematological features. *Acta Haematol*. 2010;124:162-70.
54. Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radical Bio Med*. 2007;43(11):1469-83.
55. Adam P. Sociologia da doença e da medicina. Bauru: EDUSC; 2001.
56. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Ver Bras Hematol Hemoter*. 2000;22(1):5-22.
57. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. *Williams hematology*. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
58. Galiza Neto G, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira MLC, Farias DAB. Análise dos haplótipos do gene da  $\beta$ s-globina no Ceará. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;45(2):115-8.
59. Jones-Lecointe A, Smith E, Romana M, Gilbert MG, Charles WP, Saint-Martin C, et al. Beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in sickle cell disease patients from Trinidad. *Am J Human Biol*. 2008;20(3):342-4.
60. Romero WER, Renauld GFS, Villalobos MAC. Haplotipos de la hemoglobina S: importância epidemiológica, antropológica y clínica. *Rev Panam Salud Publica*. 1998;3(1):1-8.
61. Goncalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(10):1283-8.
62. Neto GCGN, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;39(1):51-6.
63. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000;22(1):5-22.
64. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18:R216-23.
65. Gualandro SFM. A associação anemia falciforme e hemoglobina fetal. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(6):403-4.
66. Epstein FH. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1997;337(11):762-9.
67. Kulozik AE, Kar BC, Satapathy BE, Serjeant GR, Weatherall DJ. Fetal hemoglobin levels and  $\beta$ s globin haplotypes in an Indian population with sickle disease. *Blood*. 1987;69(6):1242-6.
68. Greer JP, Foerster J, Lukens JN. *Wintrobe's clinical hematology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
69. Barth D, Hirschmann JV. Anemia. In: Tkachuk DC, Hirschmann JV, editores. *Wintrobe: atlas colorido de hematologia*. Rio de Janeiro: Revinter; 2010.
70. Arai M, Henneberg R, Nascimento AJ, Arai JY, Silva PH. Reticulocitograma em pacientes com anemia falciforme e hemoglobinopatia SC. *Biol Health Sci*. 2011;17(1):53-8.
71. Ballas SK, Larner J, Smith ED, Surrey S, Schwartz E, Rappaport EF. The xerocytosis of Hb SC disease. *Blood*. 1987;69(1):124-30.
72. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. *Clinical hematology: principles, procedures, correlations*. 2nd ed. New York: Lippincott; 1998.



73. Oliveira RAG, Neto AP. Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais. São Paulo: Roca; 2004.
74. Zago MA, Silva JR, Franco RF. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. *Cienc Cult*. 1999;51(3-4):226-34.
75. Naoum PC. Diagnóstico das hemoglobinopatias. São Paulo: Sarvier; 1987.
76. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010;149(1):35-49.
77. Hicksg EJ, Griep JA, Nordschow CD. Comparison of results for three method of hemoglobin S identification. *Clin Chem*. 1973;19(5):533-5.
78. Surve RR, Mukherjee MB, Kate SL, Nagtilak SB, Wadia M, Tamankar AA, et al. Detection of the beta s gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and haemoglobin electrophoresis. *Br J Biomed Sci*. 2000;57(4):292-4.
79. Woitowicz EJ, Henneberg R, Silva PH, Nascimento AJ. Sickle cell trait: a comparative study of laboratory techniques used for screening the disease. *Visão Acadêmica*. 2010;11(2):74-9.
80. Naoum PC. Dosagem espectrofotométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(1):19-22.
81. Evelyn KA, Malloy HT. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J Biol Chem*. 1938;126:655-7.
82. Rechetzki KF, Henneberg R, Silva PH, Nascimento AJ. Reference values for methemoglobin concentrations in children. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(1):14-6.
83. DeLeo VA, Poh-Fitzpatrick M, Mathews-Roth M, Harber LC. Erythropoietic protoporphyria. 10 years experience. *Am J Med*. 1976;60(1):8-22.
84. Cox TM, Alexander GJ, Sarkany RP. Protoporphyria. *Semin Liver Dis*. 1998;18(1):85-93.
85. Grandchamp B. Acute intermittent porphyria. *Semin Liver Dis*. 1998;18(1):17-24.
86. Sassa S, Solish G, Levere RD, Kappas A. Studies in porphyria. IV. Expression of the gene defect of acute intermittent porphyria in cultured human skin fibroblasts and amniotic cells: prenatal diagnosis of the porphyric trait. *J Exp Med*. 1975;142(3):722-31.
87. Lee GR. Anemias macrocíticas megaloblasticas e não-megloblasticas. In: Lee GR, Bitchell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, organizadores. Wintrobe: hematologia clinica. São Paulo: Manole; 1998.
88. Hillman RS, Finch CA. Manual da série vermelha. 7. ed. São Paulo: Santos; 2001.
89. Cox EV, editor. The clinical manifestations of vitamina B12 deficiency in Addisonian pernicious anemia. 2nd ed. Stuttgart: Europaishes Symposium; 1962.
90. Borch K, Liedberg G. Prevalence and incidence of pernicious anemia: an evaluation for gastric screening. *Scand J Gastroentero*. 1984;19(2):154-60.
91. Chanarin I. The megaloblastic anemias. London: Blackwell Scientific; 1979.
92. Chan CW, Liu SY, Kho CS, Lau KH, Liang YS, Chu WR, et al. Diagnostic clues to megaloblastic anaemia without macrocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2007;29:163-71.
93. Babior BM. Folate, cobalamin, and megaloblastic anemias. In: Lichtman MA, Beulter E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal J, editors. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
94. Emerson PM, Wilkinson JH. Lactate dehydrogenase in the diagnosis and assessment of response to treatment of megaloblastic anaemia. *Br J Haematol*. 1966;12(6):678-88.
95. Nagel RL, Steinberg MH. Genetic of the Bs gene: origins, genetic, epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: Steinberg M, editor. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. New York: Cambridge University; 2001.
96. Longas MO, Poh-Fitzpatrick MB. A tightly bound protein-porphyrin complex isolated from the plasma of a patient with variegate porphyria. *Clin Chim Acta*. 1982;118(2-3):219-28.
97. Lindenbaum J, Nath BJ. Megaloblastic anaemia and neutrophil hypersegmentation. *Br J Haematol*. 1980;44(3):511-3.
98. Herbert V. Megaloblastic anemias. *Lab Invest*. 1985;52(1):3-19.
99. Lee GR. As anemias normocíticas, normocrômicas. In: Lee GR, Bitchell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, organizadores. Wintrobe: hematologia clínica. São Paulo: Manole; 1998.
100. Hillman RS, Hershko C. Acute blood loss anemia. In: Lichtman MA, Beulter E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal J, editors. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
101. Silva PH, Hashimoto Y. Coagulação: visão laboratorial de hemostasia primária e secundária. Rio de Janeiro: Revinter; 2006.
102. Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*. 2001;98(6):1654-61.
103. Saphier CJ, Repke JT. Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome: a review of diagnosis and management. *Semin Perinatol*. 1998;22(2):118-33.
104. Forman RB, Benkel SA, Novik Y, Tsai HM. Presence of ADAMTS13 activity in a patient with metastatic cancer and thrombotic microangiopathy. *Acta haematol*. 2003;109(3):150-2.
105. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976;295(6):302-4.
106. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today*. 2000;16(11):469-76.
107. el Hassan AM, Saeed AM, Fandrey J, Jelkmann W. Decreased erythropoietin response in Plasmodium falciparum malaria-associated anaemia. *Eur J Haematol*. 1997;59(5):299-304.
108. Veiga SS, Zanetti VC, Franco CR, Trindade ES, Porcionatto MA, Mangili OC, et al. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb Res*. 2001;102(3):229-37.
109. Silva PH, Hashimoto Y, Santos FA. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to Loxosceles intermedia venom. *Toxicon*. 2003;42:155-61.
110. Lorenzi TF. Manual de hematologia propedêutica e clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
111. Gallagher PG. Disorders of the red blood cell membrane: hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and related disorders. In: Lichtman MA, Beulter E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal J, editors. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.



112. Vives Corrons JL. Anemias hemolíticas: fisiopatología y diagnóstico, anemias hemolíticas congénitas. In: Vives Corrons JL, editor. Hematología clínica. Madrid: Mosby; 1994.
113. Lukens JN. Esferocitose hereditária e outras anemias associadas com anormalidades da membrana das hemácias e citoesqueleto. In: Lee GR, Bitchell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, organizadores. Wintrobe: hematologia clínica. São Paulo: Manole; 1998.
114. Lukens JN. Deficiências de glicose-6-fosfato desidrogenase e deficiências relacionadas que envolvem a via da pentose fosfato e metabolismo da glutatona. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, organizadores. Wintrobe: hematologia clínica. São Paulo: Manole; 1998.
115. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, organizadores. Wintrobe: hematologia clínica. São Paulo: Manole; 1998.
116. Foerster J. Anemias hemolíticas auto-imunes. In: Lee GR, Bitchell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, organizadores. Wintrobe: hematologia clínica. São Paulo: Manole; 1998.
117. Buck SAB. Doença hemolítica do recém-nato. In: Harming D, Calhoun L, Polesky HF, editors. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1992.
118. Bunn FH. Human hemoglobins: normal and abnormal; methemoglobinemia. In: Nathan DG, Oski FA, editors. Hematology of infancy and childhood. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1993.
119. Prchal JT, Gregg XT. Red cell enzymes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:19-23.
120. Hoffman R, Benz JR, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. Hematology: basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.



**Esta página foi deixada em branco intencionalmente**



## SÉRIE BRANCA – LEUCOGRAMA

### ASPECTOS GERAIS

8



#### ANGIOGÊNESE – A ORIGEM DAS CÉLULAS-TRONCO E A HIERARQUIA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

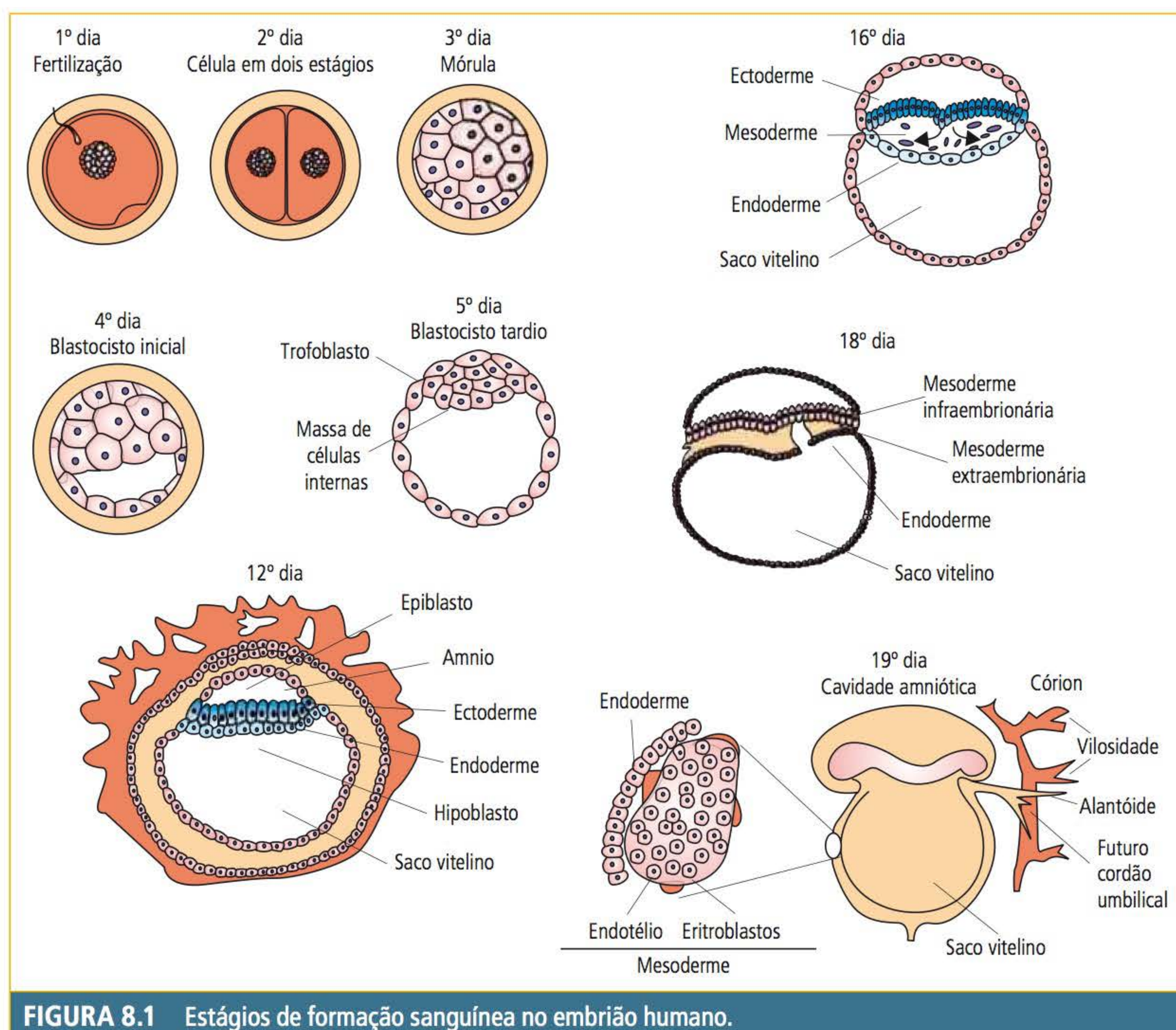
O desenvolvimento das células-tronco em mamíferos, sequencialmente, ocupa o saco vitelínico, o fígado, o baço e a medula óssea. As células-tronco ocupam esses órgãos porque encontram um microambiente favorável para que elas proliferem no sentido de autorrenovação e diferenciação. Por esse motivo, estes órgãos (fígado, baço e medula óssea) são órgãos hematopoiéticos.

Para se compreender os eventos que levam à hematopoiese embrionária, torna-se necessário entender os padrões de formação do embrião. No início da formação dos embriões dos vertebrados, o estágio de blástula consiste em duas camadas germinativas: a ectoderme e a endoderme.<sup>1,2</sup> Por meio de fatores de crescimento e da interação célula a célula, a endoderme induz a ectoderme a formar uma terceira camada germinativa, a mesoderme.<sup>1,2</sup> A partir da mesoderme, formam-se as células-tronco, que são células indiferenciadas e com capacidade de autorrenovação e diferenciação.<sup>1,2</sup> Morfologicamente, a célula-tronco assemelha-se a um linfócito pequeno,<sup>3-5</sup> apresentando como marcadores CD31+, CD34+, CD38- e CD133+,<sup>6-7</sup> sendo que o antígeno CD34 é o marcador mais utilizado para identificar, purificar e manipular a célula-tronco hematopoiética.<sup>7</sup> O CD34 é uma glicoproteína que pertence à família de moléculas adesivas chamadas sialomucinas e que está expresso na superfície de células hematopoiéticas primitivas, capazes de autorrenovação e de diferenciação nas distintas linhagens hematopoiéticas.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.1** mostra os vários estágios da formação sanguínea no embrião.

As células hematopoiéticas e os progenitores vasculares migram da mesoderme extraembrionária (18º dia – **Figura 8.1**) para formar as ilhotas sanguíneas, que originarão as linhagens hematopoiéticas primitiva e definitiva e o sistema vascular.<sup>1,2</sup> As ilhotas sanguíneas são constituídas de três camadas: endodérmica (responsável pelo crescimento das ilhotas sanguíneas), as células-tronco (que irão diferenciar-se em eritroblastos e posteriormente nas demais linhagens) e uma camada endotelial, que revestirá as ilhotas sanguíneas durante o seu desenvolvimento.<sup>1,2</sup>

A hematopoiese ocorre inicialmente no 15º dia da formação do embrião. As populações de células progenitoras estão presentes no saco vitelínico, mas a diferenciação ocorre primariamente na linhagem eritroide. Monócitos e megacariócitos podem, ocasionalmente, ser identificados nas ilhotas sanguíneas. Na medida em que ocorre a formação do sistema vascular, as células sanguíneas entram em circulação. A origem descrita das células-tronco corresponde ao período mesoblástico do desenvolvimento do sistema hematopoiético.<sup>1,2</sup> Durante a vida fetal, o tecido hepático passa a ser o principal sítio da hematopoiese, mas a produção de granulócitos e linfócitos é muito pequena; esse é o período hepático no qual o baço, o timo e os linfonodos também produzem células sanguíneas.<sup>1,2</sup>





**FIGURA 8.1** Estágios de formação sanguínea no embrião humano.

No início do quinto mês de gestação, começa a formação das cavidades ósseas para que os ossos possam transformar-se no principal sítio produtor de células após o nascimento. Após três semanas do nascimento, a medula óssea torna-se o único órgão produtor de células (em situações normais), e essa produção se estende ao longo da vida.<sup>1,2</sup> A célula-tronco é encontrada no tecido hepático entre a 5ª e a 6ª semanas de gestação, na medula óssea a partir da 10ª semana, no baço após a 11ª, no timo, quando já está comprometida com a linhagem linfóide, a partir da 10ª semana e, nos linfonodos, também já comprometida com a linhagem linfóide, a partir da 12ª semana.<sup>1,2</sup>

Todas as células sanguíneas são derivadas da célula-tronco, que é uma célula totipotente porque dá origem às demais e estabelece um sistema hierárquico de maturação.<sup>1,2</sup> Pela sua grande capacidade de proliferação e diferenciação, povoa os

órgãos hematopoiéticos com tal quantidade de células que faz do tecido hematopoiético o maior órgão do organismo humano. A renovação das células é extraordinária. Para um homem com peso de 70 kg, estima-se uma produção celular (tecido hematopoiético) de aproximadamente um trilhão de células por dia.<sup>1,2</sup> O suporte para essa quantidade de células renovadas diariamente está baseado na população das células-tronco totipotentes, que dá origem a todas as células, mas não consegue exercer a função das células maduras, as quais ela origina.<sup>1,2</sup>

O conceito de proliferação no sentido de autorrenovação significa a célula-tronco dar origem por mitose a duas células-tronco mantendo, desse modo, a população de células-tronco constante. O conceito de diferenciação implica que a célula-tronco possa dar origem a duas células diferenciadas. Esse tipo de divisão é chamado de simétrica e permite que a população de células-tronco seja



regulada e que a autorrenovação e a proliferação sejam controladas.<sup>1,2</sup>

O sistema hierárquico de maturação das células hematopoiéticas inicia com a diferenciação das células-tronco em células pluripotentes comprometidas ou com a linhagem mieloide ou com a linfoide. O termo comprometida ou comprometimento celular significa que a célula progenitora iniciou a diferenciação e essa é irreversível, ou seja, a célula diferenciada não retorna à forma da progenitora.<sup>1,2</sup> Existem duas teorias sobre como ocorre o comprometimento celular. A primeira diz que o comprometimento celular se dá pela ligação de fatores de crescimento a um receptor específico. Essa ligação torna a célula ativada, ou seja, desencadeia uma sequência de expressões gênicas que levam a célula a um processo de diferenciação morfológica específica e irreversível.<sup>1,2</sup> O processo é específico porque leva à diferenciação para uma determinada linhagem celular; irreversível porque a célula diferenciada continuará pela ação dos fatores de crescimento até a sua forma madura e funcional no sangue periférico e/ou tecido. A segunda teoria propõe que as mudanças nas expressões gênicas que levam à diferenciação celular ocorrem ao acaso e não são influenciadas pelo ambiente.<sup>1,2</sup>

Os fatores de crescimento são glicoproteínas com a localização gênica e os respectivos receptores celulares conhecidos. Com base em características estruturais e funcionais, os fatores de crescimento são classificados em duas famílias: a das citocinas e a das tirosinoquinases.<sup>1,2</sup> O **Quadro 8.1** relaciona os fatores de crescimento pertencentes à família das citocinas.

QUADRO 8.1 Fatores de crescimento pertencentes à família das citocinas	
SIGLA	NOMENCLATURA
IL (interleucinas)	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-24,IL-26, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12 e IL-15
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
IFN	Interferon α (alfa), β (beta) e γ (gama)
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
LIF	Fator inibidor de leucemias

Os receptores presentes na membrana celular interagem com várias proteínas intracelulares. Quando o fator de crescimento liga-se ao seu

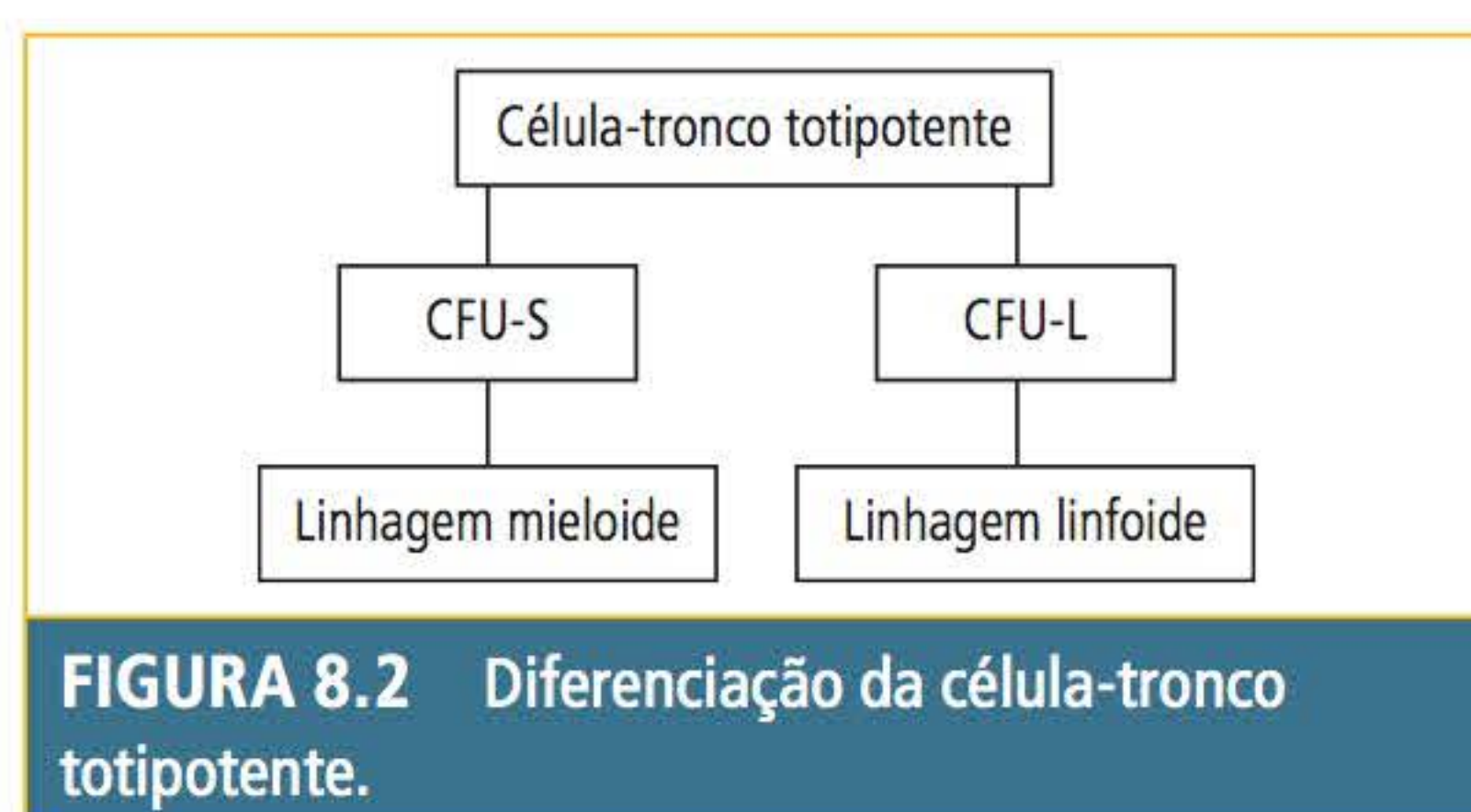
receptor, desencadeia um efeito intracelular com síntese de proteínas específicas que fazem com que a célula entre no ciclo celular com a finalidade de proliferar ou se diferenciar ou exerça a sua função como célula madura.<sup>1,2</sup>

O segundo grupo de fatores de crescimento hematopoiético é aquele cujos receptores celulares são proteínas tirosinoquinases. Os principais fatores são o *KIT*-ligante e o CSF-1 (fator estimulante de colônias de macrófagos), e os respectivos receptores são produtos derivados do gene *C-KIT* e do *C-FMS*, ambos proto-oncogenes.<sup>1,2</sup> O receptor do *KIT*-ligante na célula-tronco é chamado de *C-KIT* RTK, também conhecido como CD117. É uma glicoproteína transmembrana de 145 kDa, com função na proliferação e na diferenciação celular, e mutações nesse receptor predispõem ao desenvolvimento de tumores e leucemias.<sup>8</sup> A inibição do receptor *KIT*-ligante rapidamente induz a um quadro de pancitopenia com diminuição de células-tronco na medula óssea.<sup>9</sup>

Estudos em camundongos, *in vitro*, demonstraram que a ausência ou deficiência dos fatores de crescimento levam à perda total ou parcial da função celular.<sup>1,2</sup> O fator CSF-1 é importante para a produção normal de alguns tipos de macrófagos; o GM-CSF é importante para a função de macrófagos alveolares. A deficiência desses fatores predispõe o paciente à pneumonia causada por bactérias e fungos. O fator G-CSF é responsável pela manutenção do número normal de neutrófilos e pelos progenitores de neutrófilos e macrófagos na medula óssea; sua deficiência predispõe a infecções bacterianas.<sup>1,2</sup> Os fatores de crescimento são fundamentais para a proliferação, a diferenciação e a resposta celular a processos inflamatórios ou infecciosos.

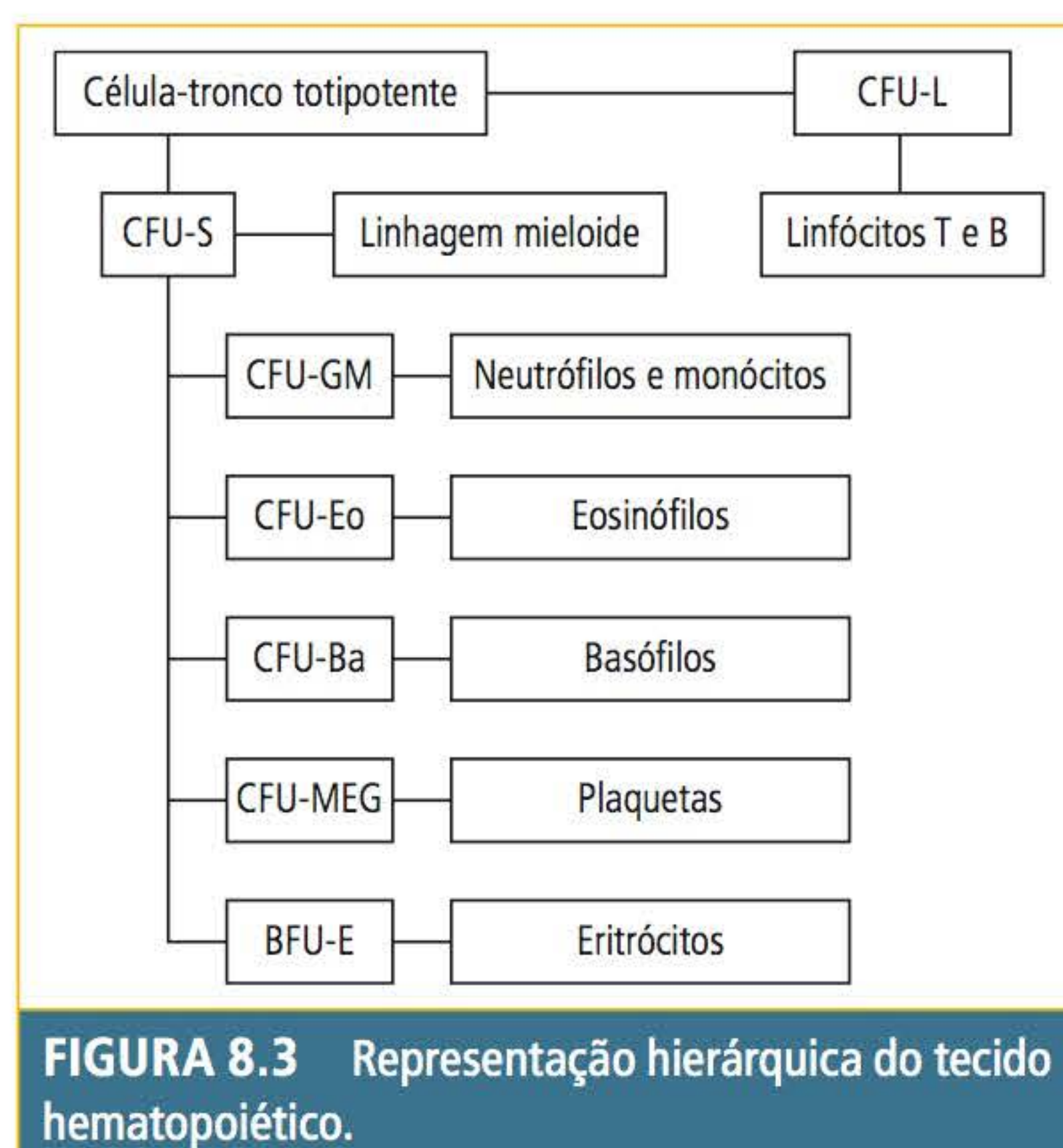
Por ação de fatores de crescimento, a célula-tronco compromete-se ou com a linhagem mieloide ou com a linfoide. Quando comprometida com a linhagem mieloide, forma a célula-tronco pluripotente CFU-S. Quando comprometida com a linhagem linfoide, forma a célula-tronco pluripotente CFU-L. As células CFU-S recebem a designação “S” (baço, do inglês *spleen*) porque foi demonstrado que essas células são capazes de regenerar o tecido hematopoiético a partir do baço de ratos que foram irradiados.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.2** mostra a diferenciação da célula-tronco totipotente.





As células CFU-S se comprometerão com a linhagem dos granulócitos e monócitos quando se diferenciarem para as células CFU-GM (unidade formadora de colônias de granulócitos e monócitos). Quando se diferenciarem para CFU-Eo (unidade formadora de colônias de eosinófilos), darão origem aos eosinófilos. As células CFU-Ba (unidade formadora de colônias de basófilos) darão origem aos basófilos. Quando diferenciadas em CFU-MEG (unidade formadora de colônias de megacariócitos), darão origem às plaquetas. Quando comprometidas com a linhagem eritrocitária, formam as células CFU-B (unidade formadora de colônias *burst* – termo que em inglês significa explosão, ou seja, ocorre a formação de uma grande quantidade desses precursores eritrocitários), e essas células formam as unidades formadoras de colônias CFU-E, que posteriormente se diferenciaram nos eritrócitos. A CFU-L, para dar origem aos diferentes tipos de linfócitos, deve migrar para o timo para se diferenciar em linfócitos T e para os sítios linfóides da medula óssea para se diferenciar em linfócitos B.<sup>1,2</sup> Toda a sequência de diferenciação da célula-tronco totipotente até as células maduras e funcionantes no sangue periférico se deve à ação dos fatores de crescimento. A **Figura 8.3** traz a representação hierárquica do tecido hematopoiético.

As células que compõem as unidades formadoras de colônias não são encontradas no sangue periférico. A CFU-GM pode-se diferenciar ou para monoblasto (dando origem a pró-monócito, monócito e macrófago no tecido) ou para mieloblasto que, na sequência de maturação, passará pelas fases de pró-mielócito, mielócito, metamielócito, bastonete e segmentado. As células CFU-Eo formarão o pró-mielócito, mielócito eosinófilo, metamielócito eosinófilo, eosinófilo em bastão e eosinófilo maduro. As CFU-Ba formarão o pró-mielócito, mielócito basófilo, metamielócito basófilo, basófilo em bastão e basófilo maduro.

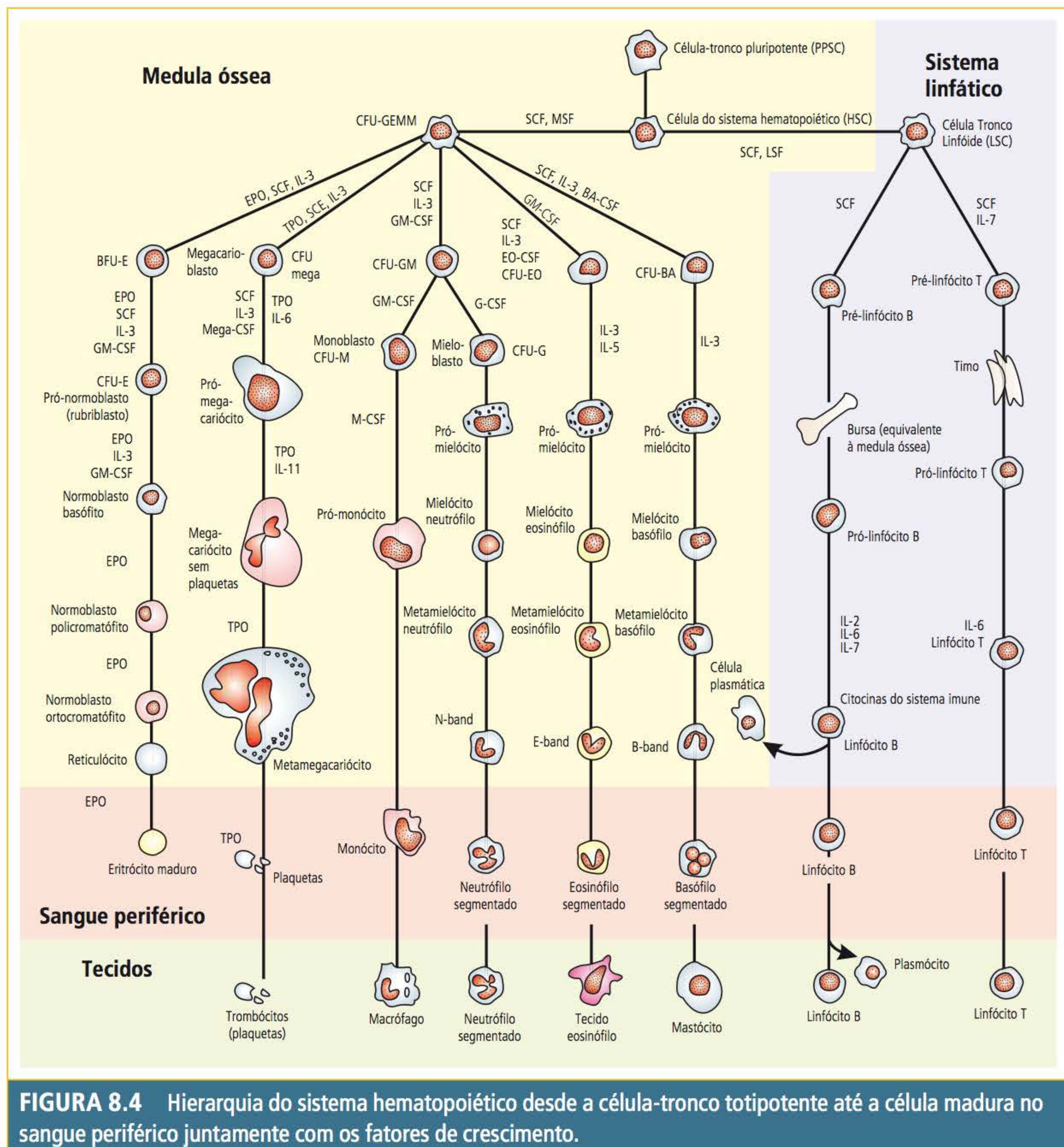


Quando se consegue identificar as granulações secundárias de basófilos e eosinófilos no citoplasma do mielócito, a célula deve ser chamada de basófilo ou eosinófilo.<sup>1,2</sup> Não há valor clínico em se diferenciar a fase de maturação do eosinófilo ou do basófilo; as fases de maturação devem ser identificadas na linhagem dos neutrófilos (mieloblasto, pró-mielócito, mielócito, metamielócito, bastonete e segmentado). As CFU-MEG originarão as plaquetas passando pelas fases maturativas de pró-megacariócito, megacariócito sem plaquetas e megacariócito produtor de plaquetas.<sup>1,2</sup> As células-tronco pluripotentes comprometidas com a linhagem linfocítica sofrem um processo de diferenciação pelo timo, formando os linfócitos T, ou pela medula óssea, formando os linfócitos B. As fases de diferenciação dos linfócitos são as seguintes: linfoblastos, pró-linfócitos e linfócitos maduros; as células plasmáticas (plasmócitos) diferenciam-se a partir dos linfócitos B e são encontradas em situações normais e em pequeno número, tanto na medula óssea quanto nos linfonodos.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.4** mostra a hierarquia do sistema hematopoiético desde a célula-tronco totipotente até a célula madura no sangue periférico juntamente com os fatores de crescimento.

### ANÁLISE DA MEDULA ÓSSEA

O exame que analisa as células da medula óssea é o mielograma, realizado a partir da punção do osso esterno ou das espinhas ilíacas anterior ou posterior.<sup>10</sup> A crista ilíaca é preferida ao esterno





em crianças e em adultos pelo risco de perfuração da tábua interna do esterno e de lesão aos grandes vasos ou ao ventrículo subjacente.<sup>10</sup> O aspirado obtido é o sangue dos sinusoides da medula óssea. A partir desse aspirado são feitas extensões que diferem da extensão feita com sangue periférico porque nas primeiras podem ser visualizados fragmentos de medula.<sup>10</sup> As extensões são coradas com corante hematológico, e a primeira análise feita é quanto à celularidade da medula, que pode ser classificada como hiper celular, normo ou hipocelular.<sup>10</sup> Os megacariócitos devem ser avaliados quanto ao número, à morfologia e à sequência

de maturação.<sup>10</sup> Posteriormente, é feita a contagem diferencial a partir da contagem de 200 a 500 células na qual se avalia o estágio de maturação das células nucleadas (vermelhas e brancas), a relação mieloide/eritroide e a contagem diferencial.<sup>10</sup> A **Tabela 8.1** mostra as células hematopoiéticas encontradas na medula óssea de homens normais, o número médio em porcentagem de células contadas e a variação da contagem a partir da média.<sup>11</sup>

Existem diferenças nas contagens celulares entre crianças e adultos. O número de linfócitos encontra-se aumentado em crianças, principalmente



TABELA 8.1 Células hematopoiéticas encontradas na medula óssea, contagem média e variação a partir da média		
CÉLULA	MÉDIA (%)	VARIAÇÃO A PARTIR DA MÉDIA (%)
Mieloblasto	0,9	0,2-1,5
Pró-Mielócito	3,3	2,1-4,1
Mielócito	12,7	8,2-15,7
Metamielócito	15,9	9-24
Bastonete	12,4	9,5-15,3
Segmentado	7,4	0-12
Eosinófilo	3,1	1,2-5,3
Basófilo	↓ 0,1	0-0,2
Linfócito	16,2	11,1-23,2
Plasmócito	1,3	0,4-3,9
Monócito	0,3	0-0,8
Megacariócito	↓ 0,1	0-0,4
Células reticulares	0,3	0-0,9
Pró-eritroblasto	0	0,2-1,3
Eritroblasto basófilo	1,4	0,5-2,4
Erit. policromatófilo	21	17,9-29,2
Erit. ortocromático	2	0,4-4
Relação M/E	2,3	1,5-3,3

na faixa etária abaixo de 4 anos; esse aumento é considerado normal para essa faixa etária.<sup>1,2</sup> Plasmócitos raramente são encontradas na medula de crianças, e o número de eosinófilos é maior em crianças do que em adultos.<sup>1,2</sup> Em adultos, as células que predominam são as da linhagem mieloide, sendo os linfócitos menos numerosos.<sup>1,2</sup> A Tabela 8.2 mostra a variação (%) com a idade na contagem diferencial da medula óssea desde o nascimento até 12 anos.<sup>11</sup>

A ideia de que os sinusoides da medula óssea são ricos em blastos é errônea. Todas as células jovens que não estão presentes nos sinusoides ou que são encontradas em pequena quantidade estão localizadas no estroma da medula óssea. As células-tronco comprometidas com a linhagem mieloide ou linfoide, CFU-S, CFU-GM, CFU-Eo, CFU-Ba, CFU-Meg e BFU-E e as células mais jovens (blastos comprometidos com linhagens específicas), estão no estroma da medula óssea. Existe um controle pela medula para a liberação de células para a circulação: a célula que está no estroma tem de atingir um determinado grau de diferenciação para passar para o sinusoide e um outro grau de diferenciação para migrar ao sangue periférico. No sangue periférico, as células que são encontradas são as maduras, que posteriormente irão aos tecidos.

O estroma da medula óssea também pode ser analisado, e o exame que faz essa análise é a biópsia da medula óssea, que pode ser feita com agulhas de Jamshidi,<sup>10</sup> as quais permitem que seja retirado um pequeno pedaço do tecido ósseo (core de tecido).<sup>10</sup> O local preferido para a biópsia é a crista ilíaca.<sup>10</sup> Com o material da biópsia, podem ser feitos *imprints* para a análise celular e, após a fixação, são preparados cortes histológicos para fazer o exame histológico.<sup>10</sup>

MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS NORMAIS ENCONTRADAS NOS SINUSOIDES DA MEDULA ÓSSEA E NO SANGUE PERIFÉRICO

⚡ MIELOBLASTO

É uma célula típica de medula óssea encontrada na proporção de 0,9% (variando de 0,2-1,5%) e é vista no sangue periférico somente em situações patológicas. Apresenta forma arredondada, tamanho médio e relação núcleo-citoplasma alta. O citoplasma, portanto, é escasso e com basofilia

TABELA 8.2 Variação (%) com a idade na contagem diferencial da medula óssea desde o nascimento até 12 anos				
CÉLULAS	NASCIMENTO	1-12 MESES	1-4 ANOS	4-12 ANOS
Série mieloide	60 (42-78)	33 (17-47)	50 (32-68)	52 (35-69)
Eosinófilos	03 (01-05)	03 (01-05)	0 (02-10)	03 (01-05)
Linfócitos	14 (03-25)	47 (34-63)	22 (08-36)	18 (12-28)
Série eritroide	14 (02-28)	08 (02-16)	19 (11-27)	21 (11-31)
Relação M/E	4,3	4,0	2,6	2,5



variando de discreta a moderada e sem granações.<sup>1,2</sup> O núcleo é redondo ou ovalado; algumas vezes, apresenta forma irregular, lembrando uma morfologia monocitoide, podendo ter localização excêntrica ou central.<sup>1,2</sup> A cromatina é fina e reticulada, distribuindo-se de modo homogêneo por todo o núcleo, conferindo-lhe um aspecto delicado.<sup>1,2</sup> O número de nucléolos varia de 0 a 5 caracterizados como distintos (facilmente visualizados) mas não proeminentes.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.5** mostra fotos de mieloblastos.

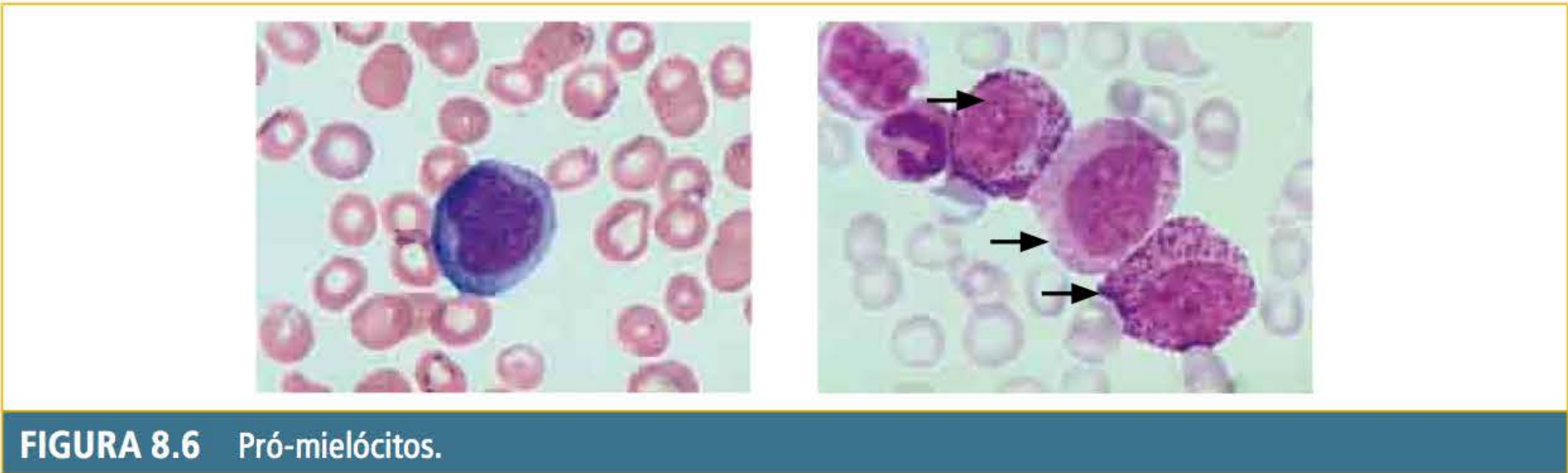
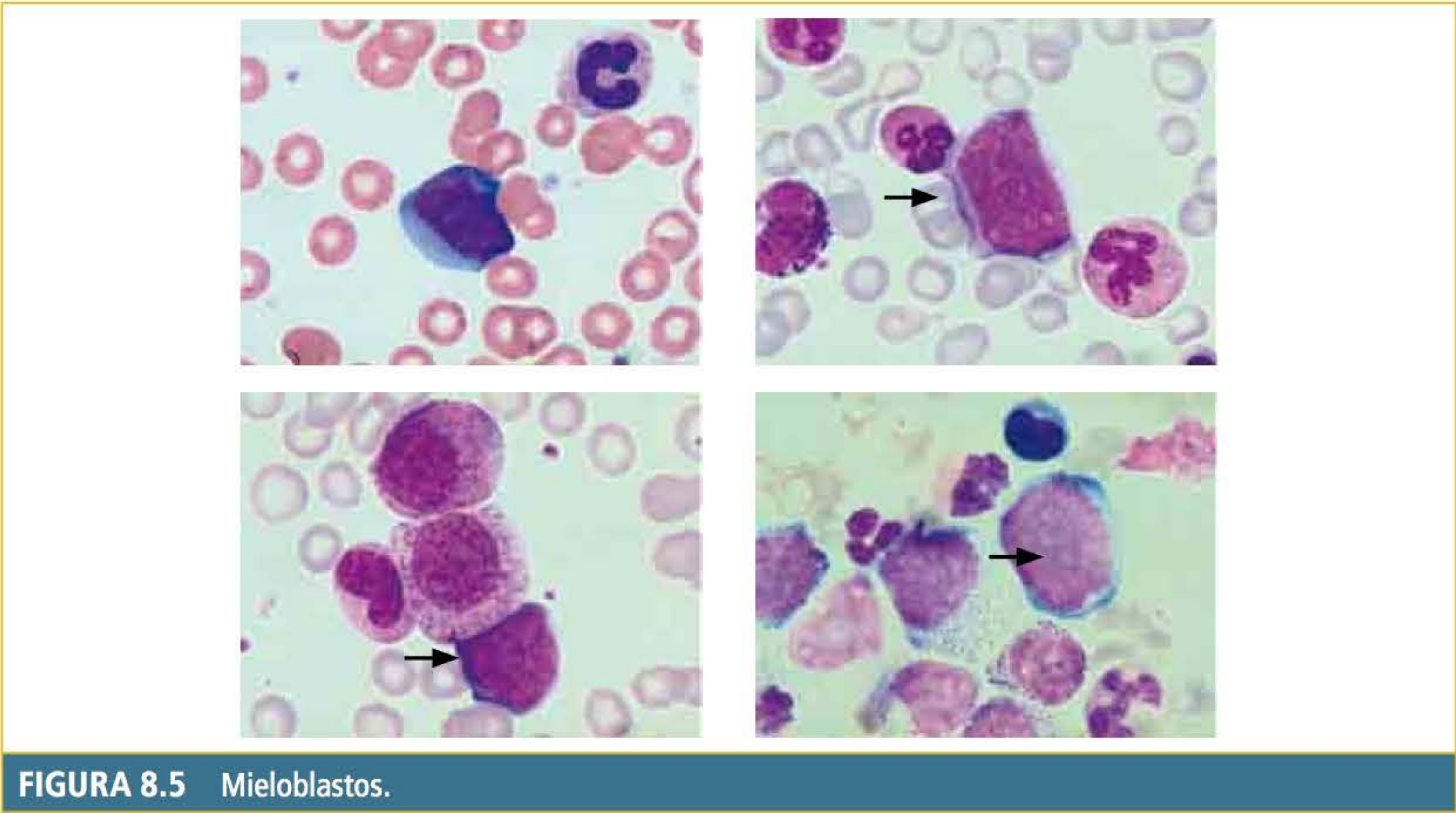
❑❑ **PRÓ-MIELÓCITO**

É uma célula típica de medula óssea encontrada na proporção de 3,3% (variando de 2,1-4,1%) e é vista no sangue periférico somente em situações patológicas. Apresenta o mesmo padrão morfológico que o mieloblasto; a diferença entre os dois é que o pró-mielócito geralmente é uma célula

maior (apesar de o tamanho não ser um bom parâmetro para a avaliação celular) e apresenta granações azurrófilas (também chamadas de primárias ou inespecíficas).<sup>1,2</sup> As granulações primárias aparecem a partir desse estágio, são formadas no aparelho de Golgi e contêm substâncias antimicrobianas.<sup>1,2</sup> A quantidade de granulações primárias é variável, podendo apresentar uma pequena ou uma grande quantidade e, muitas vezes, podem estar sobre o núcleo.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.6** mostra fotos de pró-mielócitos.

❑❑ **MIELÓCITO**

Célula típica de medula óssea encontrada na proporção de 12,7% (variando entre 8,2-15,7%). No mielócito, o padrão celular muda porque a cromatina adquire o aspecto da cromatina de um neutrófilo.<sup>1,2</sup> O núcleo geralmente é excêntrico, redondo ou ovalado, e o nucléolo não é mais visível.<sup>1,2</sup>





As características morfológicas que permitem a distinção entre o pró-mielócito e o mielócito são a ausência de nucléolo e a condensação e heterogeneidade da cromatina. O citoplasma pode apresentar granulações primárias e secundárias.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.7** mostra fotos de mielócitos.

### ■ METAMIELÓCITOS, BASTONETES E SEGMENTADOS

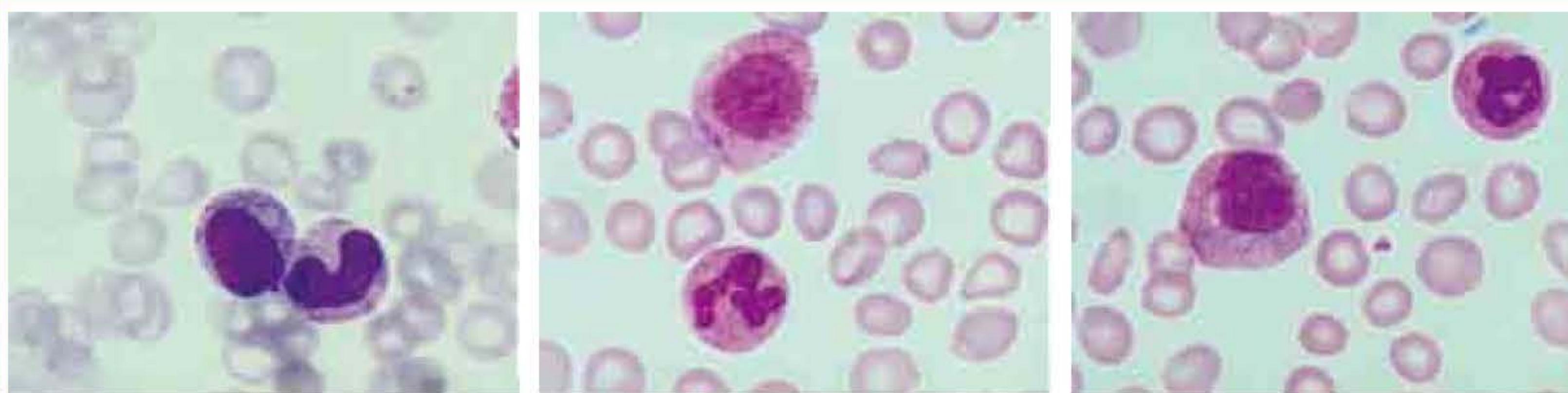
Apresentam o mesmo padrão celular que o mielócito; a diferença está na ausência das granulações primárias e na forma do núcleo. O metamielócito apresenta um núcleo excêntrico redondo ou ovalado, mas com uma reentrância (chanfradura); o bastonete apresenta a forma do núcleo em bastão, a reentrância, ou chanfradura, faz com que essa forma de bastão apresente-se curvada; e o segmentado apresenta constrições, unidas por filamentos de cromatina, que formam dois ou mais lóbulos nucleares.<sup>1,2</sup> As granulações secundárias presentes em todo o citoplasma dessas células coram-se tanto pelo azul de metileno como pela eosina e apresentam uma cor rósea. O termo neutrófilo deriva do fato de as granulações serem neutras.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.8** mostra fotos de metamielócitos, bastonetes e segmentados.

O bastonete é a célula que mais controvérsias causa na contagem diferencial (ver também

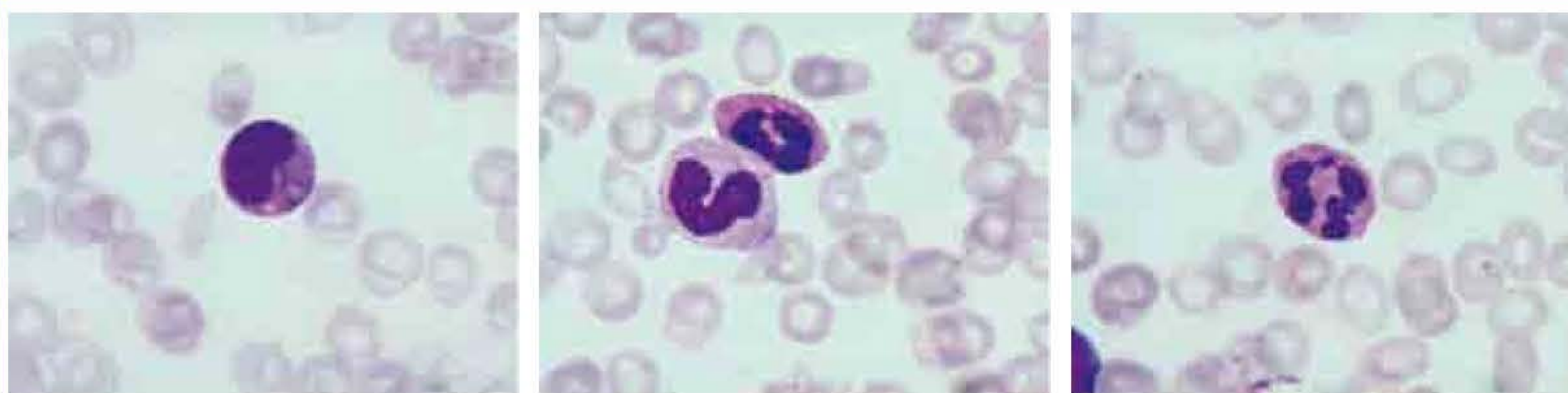
Capítulo 3, Fase analítica). De modo geral, o número elevado de bastonetes no sangue periférico está correlacionado com processos infecciosos bacterianos agudos. Esse fato gera uma expectativa em torno do número de bastonetes na contagem diferencial, a qual, muitas vezes, é levada ao microscópio quando do ato de realizar a análise morfológica. A tênue diferença morfológica entre o bastão e o segmentado tem sido causa de grande controvérsia na diferenciação morfológica das duas células. Muitas vezes, critérios pessoais de diferenciação são utilizados, mas esses critérios não encontram respaldo na literatura internacional. Os livros que são referências internacionais em hematologia trazem uma definição concreta para a diferenciação entre bastonetes e segmentados.

O livro *Laboratory medicine: hematology*, escrito por Miale<sup>12</sup> e considerado referência em hematologia, cuja última edição é de 1982 (não foi mais editado devido ao falecimento do autor), traz a seguinte definição de bastonete:

Toda célula que apresenta uma constrição em um ou mais pontos, mas nessa constrição pode ser visualizada cromatina, ela deve ser classificada como bastonete. As células que se apresentarem com núcleo dobrado e constrições, se presentes, que não possam ser visualizadas, também deve ser classificada como bastonete [...].<sup>12</sup>



**FIGURA 8.7** Mielócitos.



**FIGURA 8.8** Metamielócitos, bastonetes e segmentados.



Ele considera que o valor de referência para bastonetes é de  $8 \pm 3$ , variação entre 5 a 11%. Beutler e colaboradores<sup>13</sup> trazem a definição de segmentados e bastonetes:

O neutrófilo (*neutrophils*) apresenta um núcleo lobulado, com 2 a 5 lóbulos conectados por um fino filamento (...) os bastonetes (*bands*) são idênticos aos neutrófilos polimorfonucleares, exceto que seu núcleo em forma de U ou de lóbulos rudimentares não são conectados por um filamento que contém cromatina.<sup>13</sup>

Esse autor considera como valor de referência 3%. Greer e colaboradores<sup>11</sup> comentam sobre os critérios de classificação morfológica entre as duas células e posteriormente informa qual critério deve ser seguido.

Existem opiniões diferentes no que se refere à classificação de bastonetes e segmentados. Alguns autores requerem um filamento claramente visível entre dois lóbulos para classificar a célula como segmentado; qualquer separação incompleta ou sobreposição de lóbulos que não permita identificar o filamento faz com que a célula seja classificada como bastonete. Outros autores classificam o segmentado se houver uma constrição que seja dois terços menor que a parte maior do núcleo. No entanto, uma separação clara e evidente é necessária para se contar o número de lóbulos, com finalidade diagnóstica, tanto na detecção precoce da deficiência de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> como para estabelecer a liberação de formas jovens da medula óssea para o sangue periférico. Com esse propósito, temos de ter uma clara separação entre os lóbulos nucleares para classificar a célula como segmentado. Células sem essa completa formação de lóbulos distintos (geralmente conectadas por um filamento que contém cromatina) são classificadas como bastonetes.<sup>11</sup>

O Colégio Americano de Patologia define bastonete como qualquer célula madura da linhagem granulocítica, curvada, com a forma do núcleo em bastão e que não desenvolveu um filamento de cromatina. Se a cromatina é vista na ponte que une os lóbulos, essa célula é um bastão. Caso o núcleo esteja superposto ou dobrado e não possa ser visto por inteiro, a célula deve ser classificada como segmentado. O valor de referência varia de 0 a 5%.<sup>1,2</sup> O National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCSL) adota a mesma definição, mas considera como valor de referência o intervalo de 5 a 10%.<sup>1,2</sup> Para James H. Jandl, 1998,

uma ou mais constrições podem ser vistas em neutrófilos, mas a célula só será classificada como segmentado se houver uma clara separação de lóbulos conectados somente por um filamento; o valor de referência varia de 1 a 5%.<sup>1,2</sup>

Os autores citados são referência internacional em hematologia e há uma unanimidade entre eles quanto ao conceito de bastonete a ser utilizado quando se faz a contagem diferencial dos leucócitos. Esse conceito deve ser discutido e compreendido entre os profissionais que fazem a contagem diferencial e padronizado no laboratório. Periodicamente, os profissionais envolvidos com contagem diferencial devem fazer a contagem de uma mesma lâmina, e os resultados devem ser comparados e discutidos. Caso haja discrepâncias significativas entre as contagens, o conceito deve ser rediscutido. Esse procedimento leva os profissionais a realizarem contagens com resultados semelhantes (diferenças estatisticamente não significativas), e a comparação de hemogramas, lidos por diferentes profissionais, pode ser feita.<sup>1,2</sup> A **Tabela 8.3** mostra a variação estatisticamente não significativa ou permitida para a contagem diferencial de leucócitos em um intervalo de confiança de 95%.<sup>12</sup>

TABELA 8.3 Intervalo de confiança de 95% para a contagem diferencial		
% CONTADO DE UMA DETERMINADA CÉLULA	VARIAÇÃO PERMITIDA EM 100 CÉLULAS CONTADAS	VARIAÇÃO PERMITIDA EM 200 CÉLULAS CONTADAS
0	0-3	0-1,5
1	0,5-4,7	0,2-3,1
2	0,4-6,3	0,7-4,6
3	0,8-7,7	1,3-5,9
4	1,4-9,1	2-7,2
5	2-10,5	2,7-7,2
10	4-16	5,8-14,2
20	12-28	14,3-25,7
30	20,8-39,2	23,5-36,5
40	30,2-49,8	33,1-46,9
50	40-60	53,1-66,9
60	50,2-69,8	53,1-66,9
70	60,8-79,2	63,5-76,5
80	72-88	74,3-85,7
90	84-96	85,8-94,2



### EOSINÓFILOS E BASÓFILOS

Sem as granulações secundárias, os granulócitos apresentam o mesmo padrão morfológico (núcleo) e não podem ser distinguidos entre si. As granulações secundárias formadas a partir do estágio de mielócito permitem essa distinção. O eosinófilo apresenta granulações que ocupam todo o citoplasma, não se sobrepõem ao núcleo, são globulosas e tomam a coloração pela eosina, adquirindo uma cor laranja-vivo.<sup>1,2</sup> O basófilo apresenta granulações grandes, planas e grosseiras, que se distribuem por todo o citoplasma, se sobrepõem ao núcleo, muitas vezes impedindo sua visualização, e coram-se em preto pelo azul de metileno.<sup>1,2</sup> Quando se reconhece a célula com a granulação eosinofílica ou basofílica independentemente de seu estágio de maturação (mielócito, metamielócito, bastonete ou segmentado), a célula deve ser classificada como eosinófilo ou basófilo. A **Figura 8.9** mostra fotos de eosinófilos e basófilos.

### LINFÓCITOS

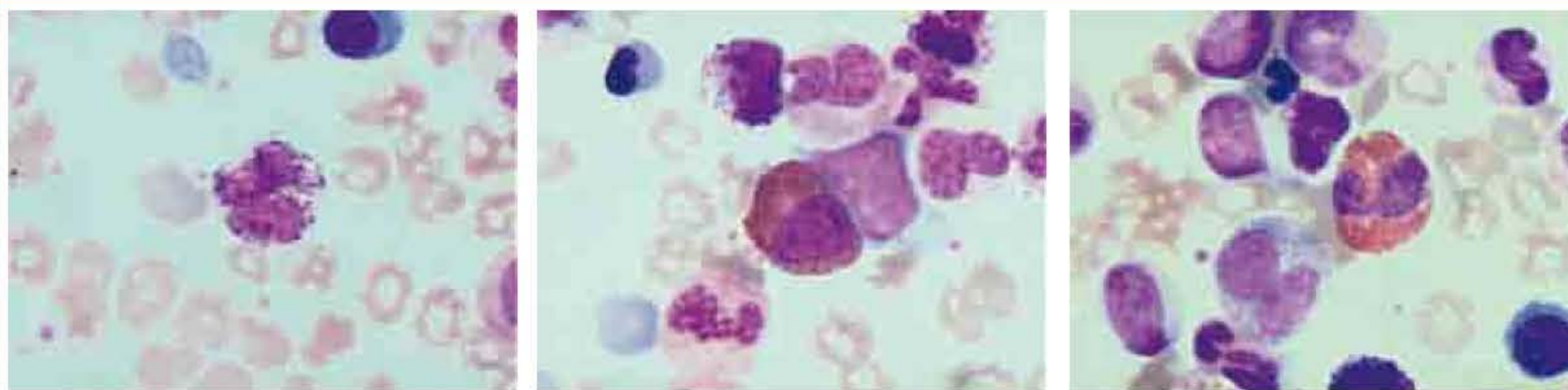
Nos sinusoides da medula óssea normal, não são encontrados linfoblastos e pró-linfócitos.<sup>1,2</sup> O linfócito pode ser classificado em pequeno, médio e grande. O núcleo é redondo ou ovalado, algumas vezes excêntrico; a cromatina é condensada formando grumos de distribuição heterogênea e,

ocasionalmente, pode ser visto um nucléolo.<sup>1,2</sup> O citoplasma (relação núcleo:citoplasma varia de 5:1 a 2:1) varia de quantidade, dependendo do tamanho do linfócito, apresenta coloração azulada e pode ter grânulos azurrófilos, o que é mais característico nos linfócitos médios e grandes.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.10** mostra fotos de linfócitos.

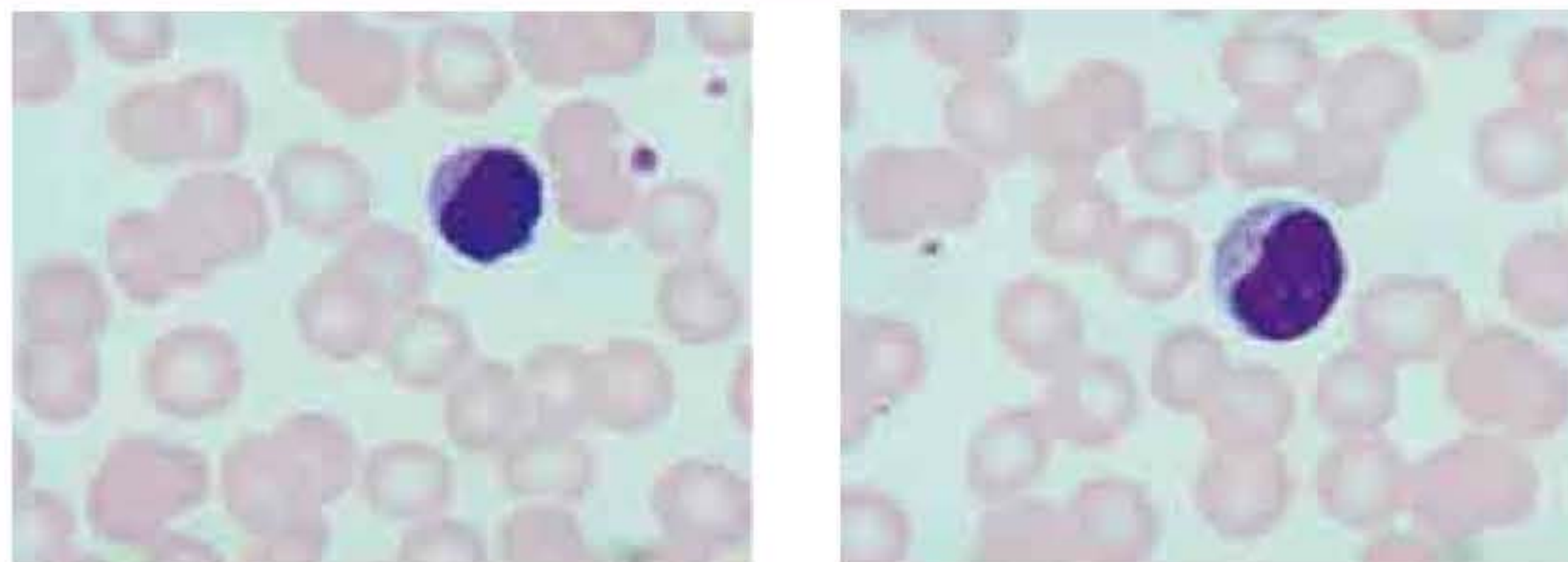
### MONÓCITOS

Nos sinusoides da medula óssea, não são encontrados monoblastos e pró-monócitos.<sup>1,2</sup> O monócito varia consideravelmente em tamanho e forma; o núcleo geralmente é grande, ovalado, convoluto e com cromatina delicada e frouxa. Pode, também, assumir uma forma irregular (bastonete, forma de “S” ou outras formas) e não apresenta nucléolos.<sup>1,2</sup> O citoplasma é abundante, cora-se em tom azulado e apresenta granulações bastante finas que se coram em tom róseo.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.11** mostra fotos de monócitos.

A diferenciação morfológica entre monócitos e linfócitos também gera uma discrepância muito grande entre os profissionais envolvidos com a contagem diferencial (ver também Capítulo 3, Fase analítica). Do mesmo modo que para a diferenciação entre bastonetes e segmentados, o conceito da morfologia dos linfócitos e monócitos deve ser discutido e padronizado; lâminas com linfocitose



**FIGURA 8.9** Eosinófilos e basófilos.



**FIGURA 8.10** Linfócitos.



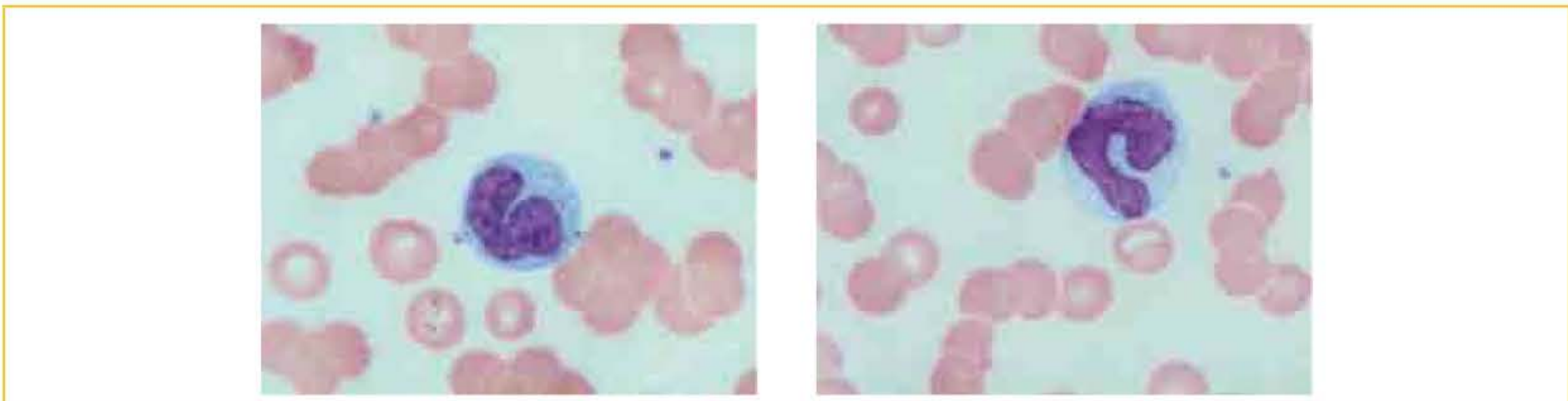


FIGURA 8.11 Monócitos.

e/ou monocitose devem ser contadas pelos profissionais envolvidos na contagem diferencial, e os resultados devem ser comparados. As discrepâncias encontradas nas contagens devem ser avaliadas no sentido de corrigir e de aproximar cada vez mais (chegando a valores de diferenças estatísticas não significativas) a contagem entre os profissionais. Essa padronização morfológica (bastonete/segmentado e linfócito/monócito) muitas vezes pode ser difícil de ser estabelecida, mas ela é necessária para evitar o confronto de dois resultados completamente distintos efetuados por dois profissionais do mesmo laboratório.

CINÉTICA DOS NEUTRÓFILOS –  
PROCESSO INFECCIOSO  
BACTERIANO AGUDO

A cinética dos neutrófilos é a movimentação dessas células em três compartimentos do organismo: a medula óssea, o sangue periférico e os tecidos. A medula óssea é o local de produção; no sangue periférico, os neutrófilos estão em um estágio intermediário do seu período de sobrevivência, e é o fluido que permite que eles migrem para todos os tecidos, os quais representam o estágio final da sobrevivência neutrofílica e o local onde eles exercem sua função.<sup>1,2</sup> A Figura 8.12 exemplifica os três compartimentos do organismo por onde se movimentam os neutrófilos.

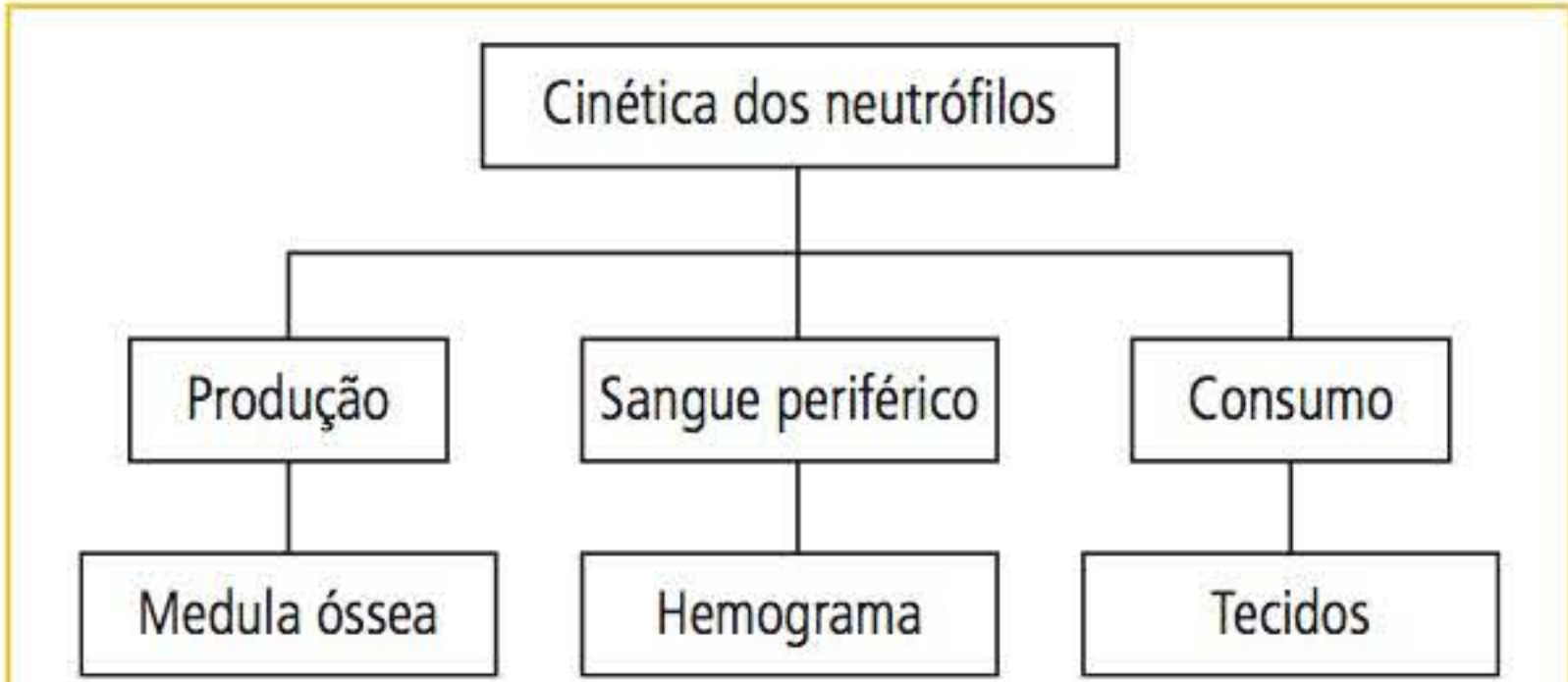


FIGURA 8.12 Compartimentos do organismo em relação à cinética dos neutrófilos.

A cinética dos granulócitos está baseada no consumo de neutrófilos pelos tecidos porque são eles que regulam a produção de granulócitos pela medula óssea. A demanda tissular e a capacidade de resposta da medula frente a essa demanda serão interpretadas pela análise do leucograma porque as alterações do equilíbrio entre a produção e o consumo tissular se refletem no sangue periférico. Como exemplo, pode ser citado um processo infeccioso bacteriano agudo em que a demanda tecidual é muito grande, e a medula óssea apresenta uma boa capacidade de resposta. O leucograma mostrará leucocitose à custa de neutrofilia com ou sem desvio nuclear à esquerda, podendo ter precursores mielóides. Dentro da medula óssea, os neutrófilos e seus precursores podem ser divididos em vários compartimentos: compartimento das células-tronco, compartimento mitótico e compartimento pós-mitótico.<sup>1,2</sup> A Figura 8.13 mostra os compartimentos de neutrófilos e seus precursores na medula óssea.

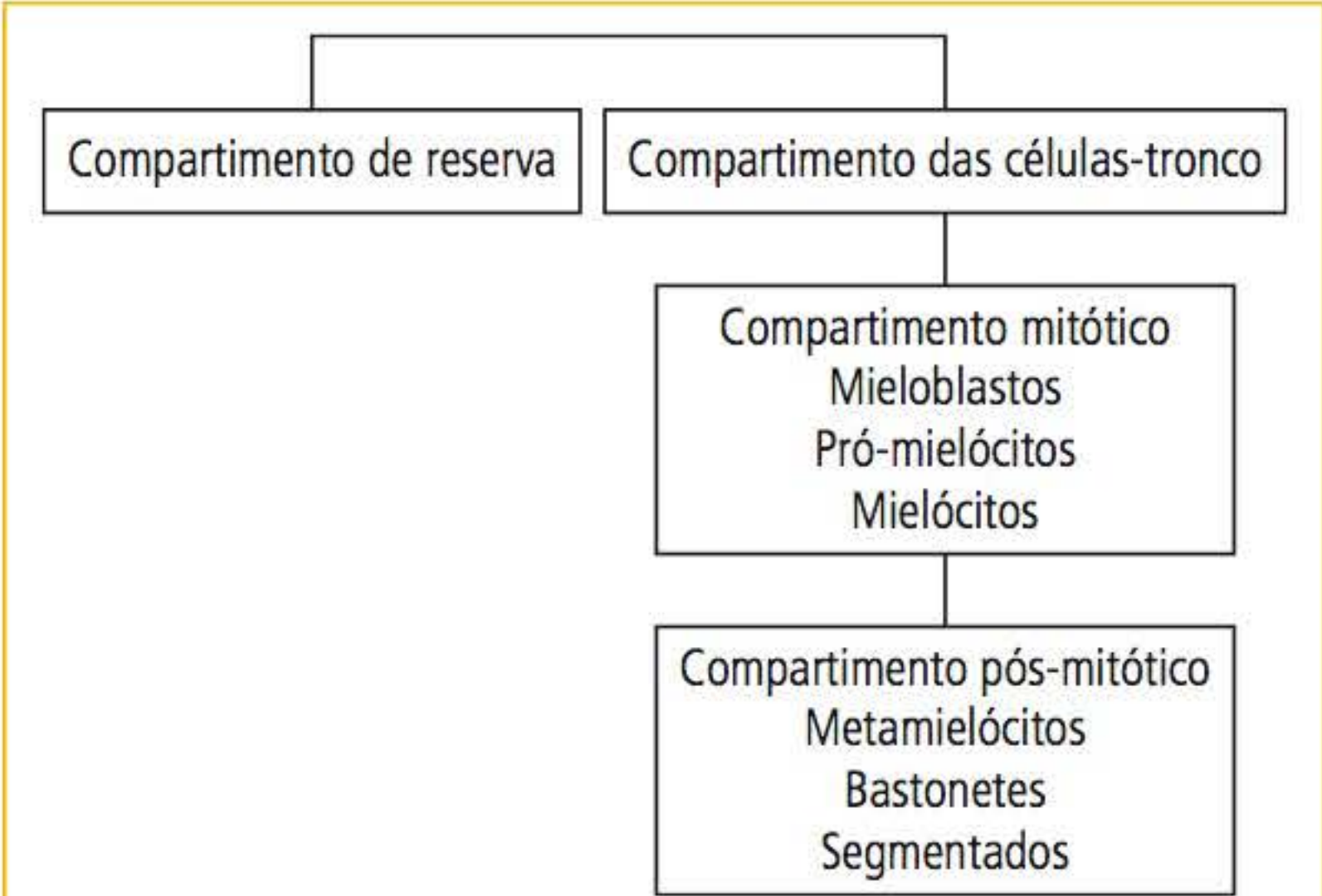


FIGURA 8.13 Compartimentos de neutrófilos e seus precursores na medula óssea.

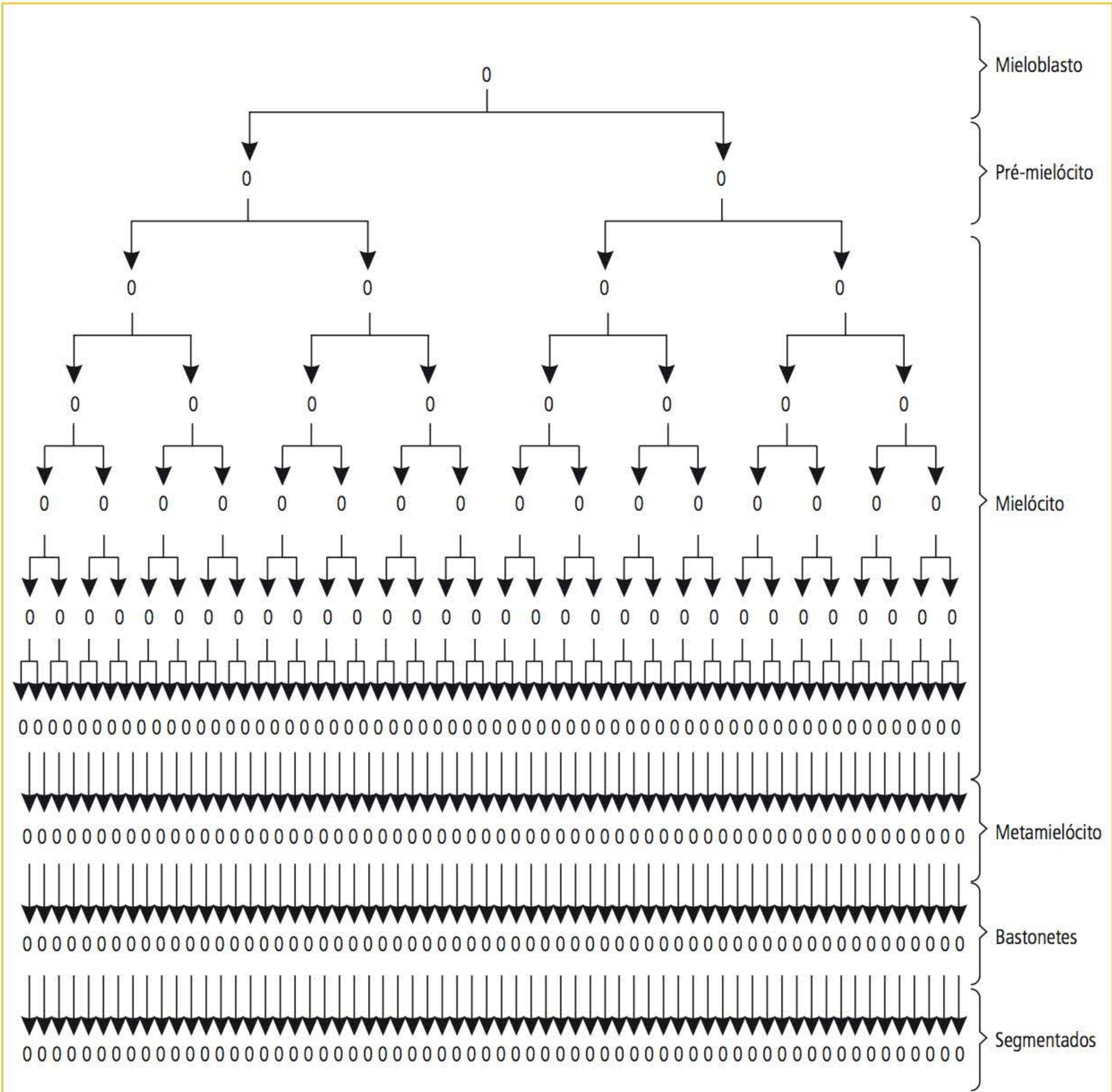
O compartimento das células-tronco é o compartimento de reserva da medula óssea representado pelas células-tronco totipotentes e pelos



precursores dos mieloblastos. Quando esse compartimento é lesado, seja uma lesão no microambiente da medula ou uma transformação clonal nas células-tronco, a hierarquia de proliferação e diferenciação celular é perdida, e patologias como leucemias ou síndrome mielodisplásica, ou aplasia podem-se instalar. O compartimento mitótico é representado pelos mieloblastos, pró-mielócitos e mielócitos; esses últimos são as células que predominam e são elas que garantem a quantidade de neutrófilos necessária aos tecidos. O mielócito pode fazer até cinco divisões celulares sem que haja diferenciação a metamielócito, e isso faz com que um único mieloblasto possa formar uma

grande quantidade de neutrófilos.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.14** mostra a formação de neutrófilos a partir de um único mieloblasto.

O compartimento pós-mitótico é representado pelos metamielócitos, bastonetes e segmentados, sendo os bastonetes as células que predominam nesse compartimento. Essa informação é interessante porque quando, no sangue periférico, são encontrados bastonetes acima do valor de referência (desvio nuclear à esquerda [DNE]), significa que essas células estão vindo da medula óssea e que o compartimento de reserva do sangue periférico já foi esgotado. A presença ou ausência de um DNE, bem como a presença de precursores

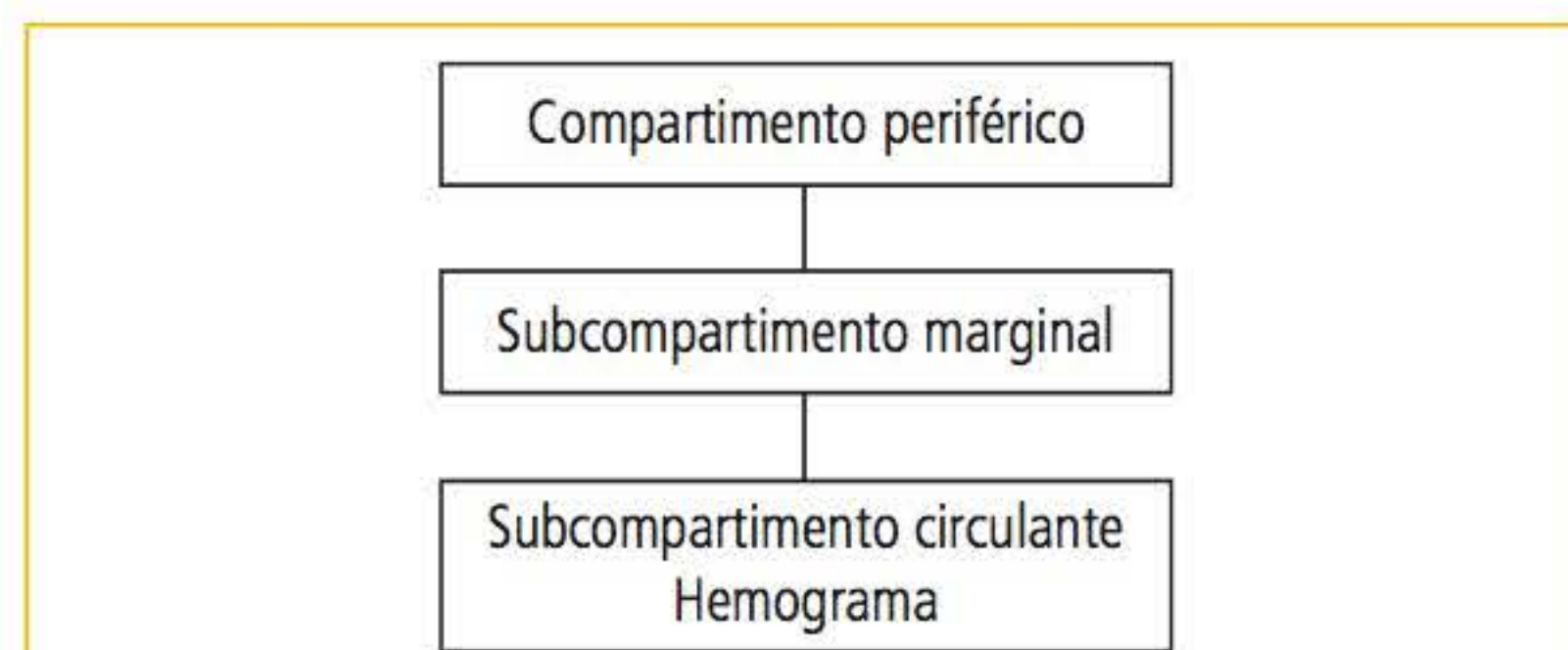


**FIGURA 8.14** Formação de neutrófilos a partir de um único mieloblasto.



mieloides, podem diferenciar um processo infeccioso de uma variação fisiológica dos neutrófilos.

Quando o neutrófilo sai da medula óssea e chega ao sangue periférico, está no compartimento periférico, que é subdividido em dois subcompartimentos: marginal e circulante. A **Figura 8.15** mostra a representação do compartimento periférico.



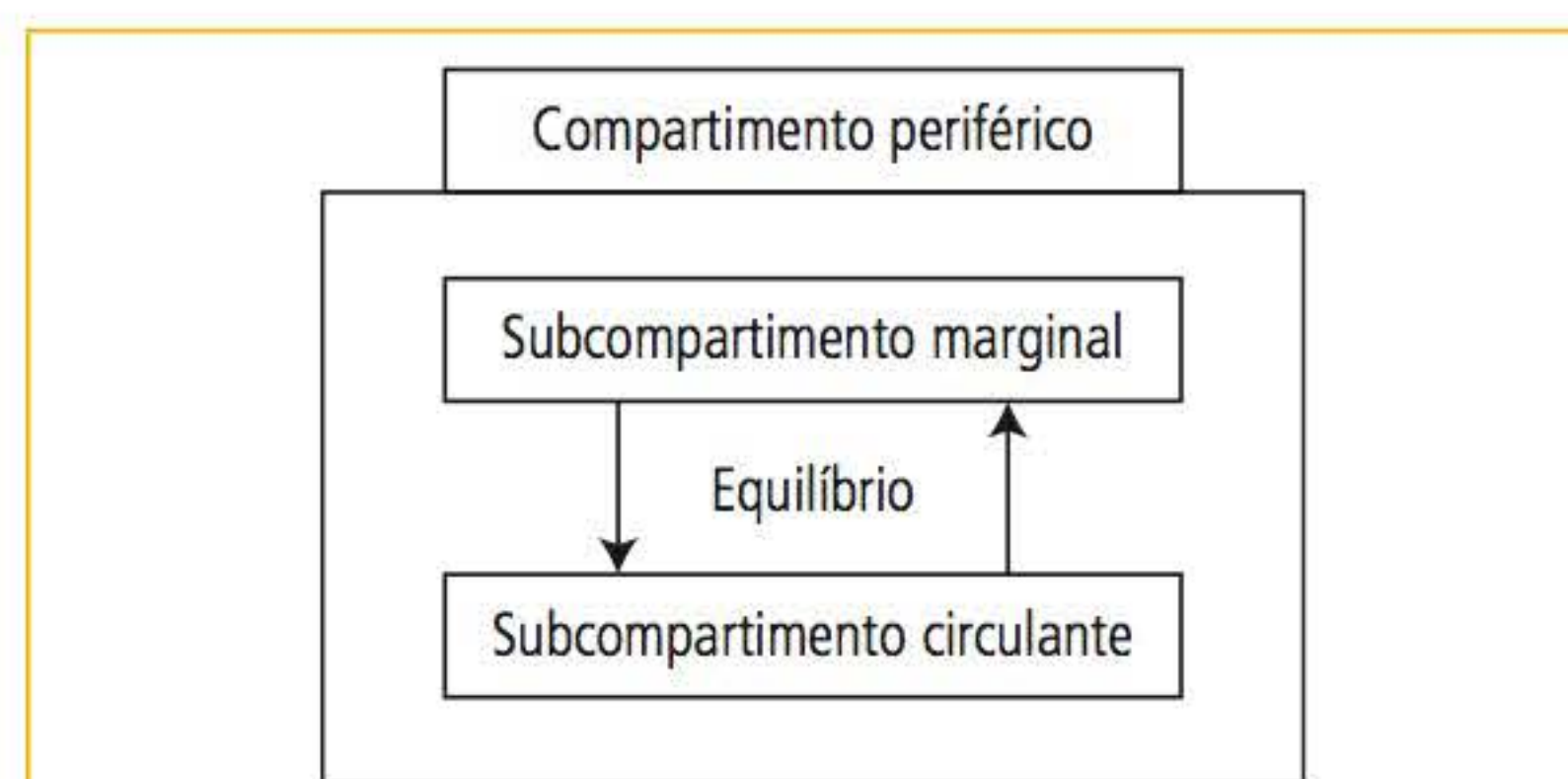
**FIGURA 8.15** Compartimento periférico.

O compartimento marginal é representado pelos neutrófilos (bastonetes e segmentados, com predomínio do último), que se aderem às células endoteliais via selectinas (glicoproteínas da superfamília das lecitinas) as quais se expressam na membrana citoplasmática dos neutrófilos com receptores nas células endoteliais. É uma adesão fraca, que pode levar os neutrófilos a saírem do subcompartimento marginal e ganharem o circulante por alterações de fluxo sanguíneo.<sup>1,2</sup> O subcompartimento circulante é representado pelos neutrófilos, também com predomínio de segmentados e é o subcompartimento avaliado quando se realiza o leucograma.

## **:: DIFICULDADES DE INTERPRETAÇÃO DO LEUCOGRAMA**

A primeira dificuldade de se interpretar o leucograma é que se está vendo apenas um subcompartimento, subcompartimento circulante, e tem-se que interpretar a cinética como um todo. Por esse motivo, o acompanhamento ou a definição da instalação de um processo infeccioso ou inflamatório devem ser feitos com leucogramas de controle. Os dois subcompartimentos têm o mesmo tamanho, estão em equilíbrio e interagem entre si (passagem de células de um subcompartimento para outro).<sup>1,2</sup> O subcompartimento marginal é considerado um compartimento de reserva de neutrófilos no sangue periférico. A **Figura 8.16** mostra a interação entre os dois subcompartimentos.

Em situações fisiológicas, existe o equilíbrio e a interação entre os dois subcompartimentos, mas

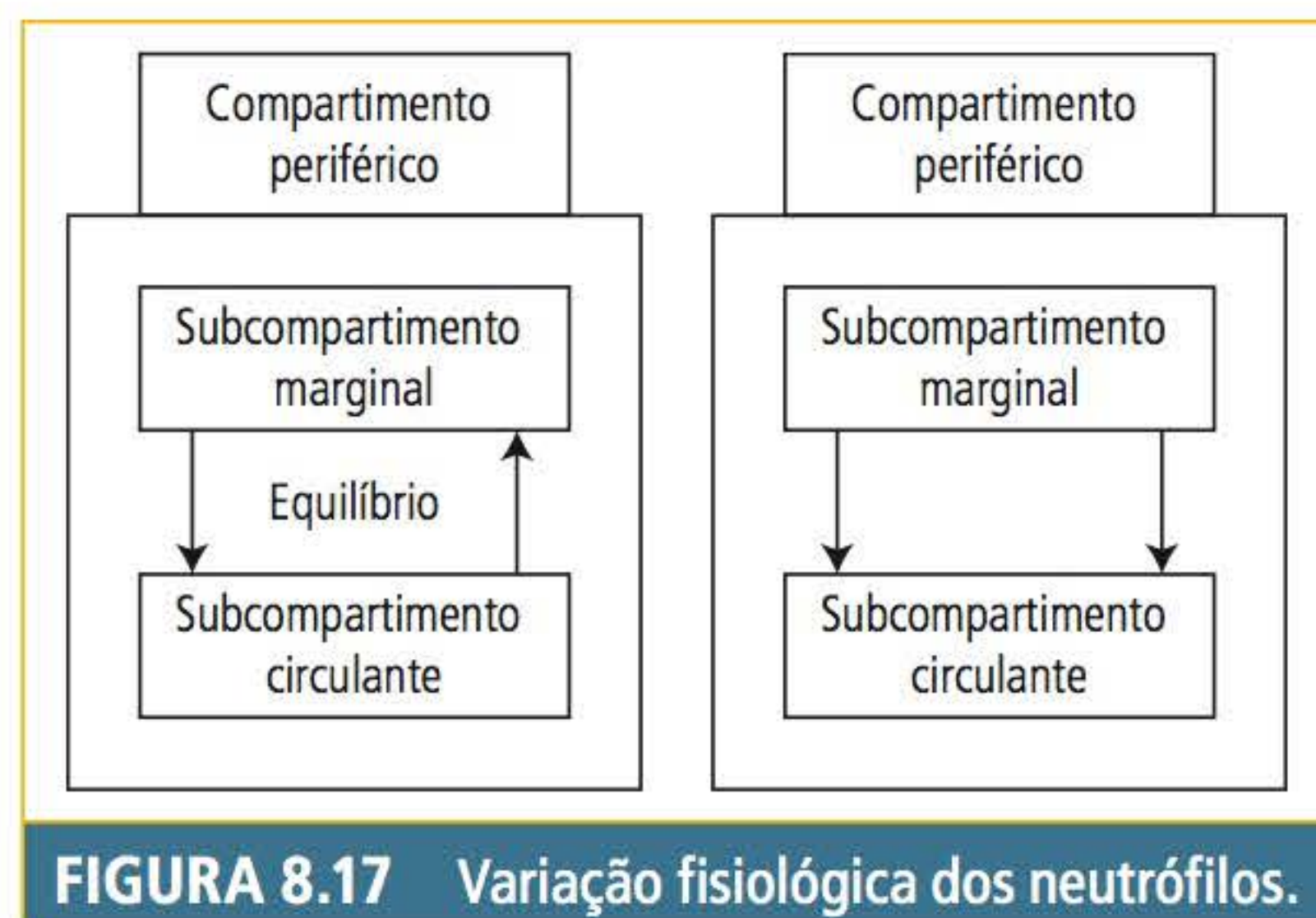


**FIGURA 8.16** Interação entre os dois subcompartimentos.

a migração de neutrófilos entre os dois subcompartimentos não causa alteração no leucograma.<sup>11</sup> Determinadas situações, como exercícios físicos vigorosos e estresse agudo físico ou emocional (ansiedade, medo e raiva),<sup>1,2</sup> resultam em uma desmarginação dos neutrófilos, e o número de leucócitos pode aumentar substancialmente, fazendo um quadro hematológico de leucocitose à custa de neutrofilia e sem DNE;<sup>14</sup> esse aumento celular ocorre em alguns minutos.<sup>14</sup> A leucocitose à custa de neutrofilia e sem DNE em exercícios físicos vigorosos pode atingir valores acima de 22.000 leucócitos/ $\mu$ L e tende a voltar aos valores fisiológicos dentro de uma hora após o término do exercício.<sup>11</sup> Convulsões, injeções de epinefrina, injeções intramusculares e intravenosas, lesões tissulares (cirurgias), taquicardia, dor, náuseas, vômitos, período ovulatório e gestação são causas de neutrofilia na ausência de um processo infeccioso ou inflamatório.<sup>11</sup> Os glicocorticoides produzem uma elevação do número de neutrófilos, com consequente leucocitose, pela diminuição da saída dos neutrófilos para os tecidos (neutrofilia por represamento).<sup>1,2</sup> Essa leucocitose com neutrofilia e sem DNE ocorre devido ao aumento do subcompartimento circulante em cerca de 50%. Esse aumento se dá à custa da saída de neutrófilos do subcompartimento marginal para o circulante sem que haja aumento do compartimento periférico, ou seja, não há saída “a maior” de células da medula óssea.<sup>1,2</sup> A importância de se conhecer a variação fisiológica dos neutrófilos é que muitos pacientes fazem exames laboratoriais após a realização de caminhadas e exercícios em academias. Alguns chegam ao laboratório de bicicleta, costumam fazer exames após a realização de teste do esforço; muitos têm pânico de agulha; coletas em crianças, muitas vezes, podem ser muito difíceis pelo fato de a criança não querer tirar sangue.



Pacientes que chegam ao hospital para serem internados estão ansiosos; em todas essas situações, as pessoas estão submetidas ao estresse emocional, e o número de leucócitos (neutrofilia) pode aumentar significativamente. Na interpretação do leucograma, essas situações devem ser levadas em conta. A **Figura 8.17** exemplifica a variação fisiológica dos neutrófilos.

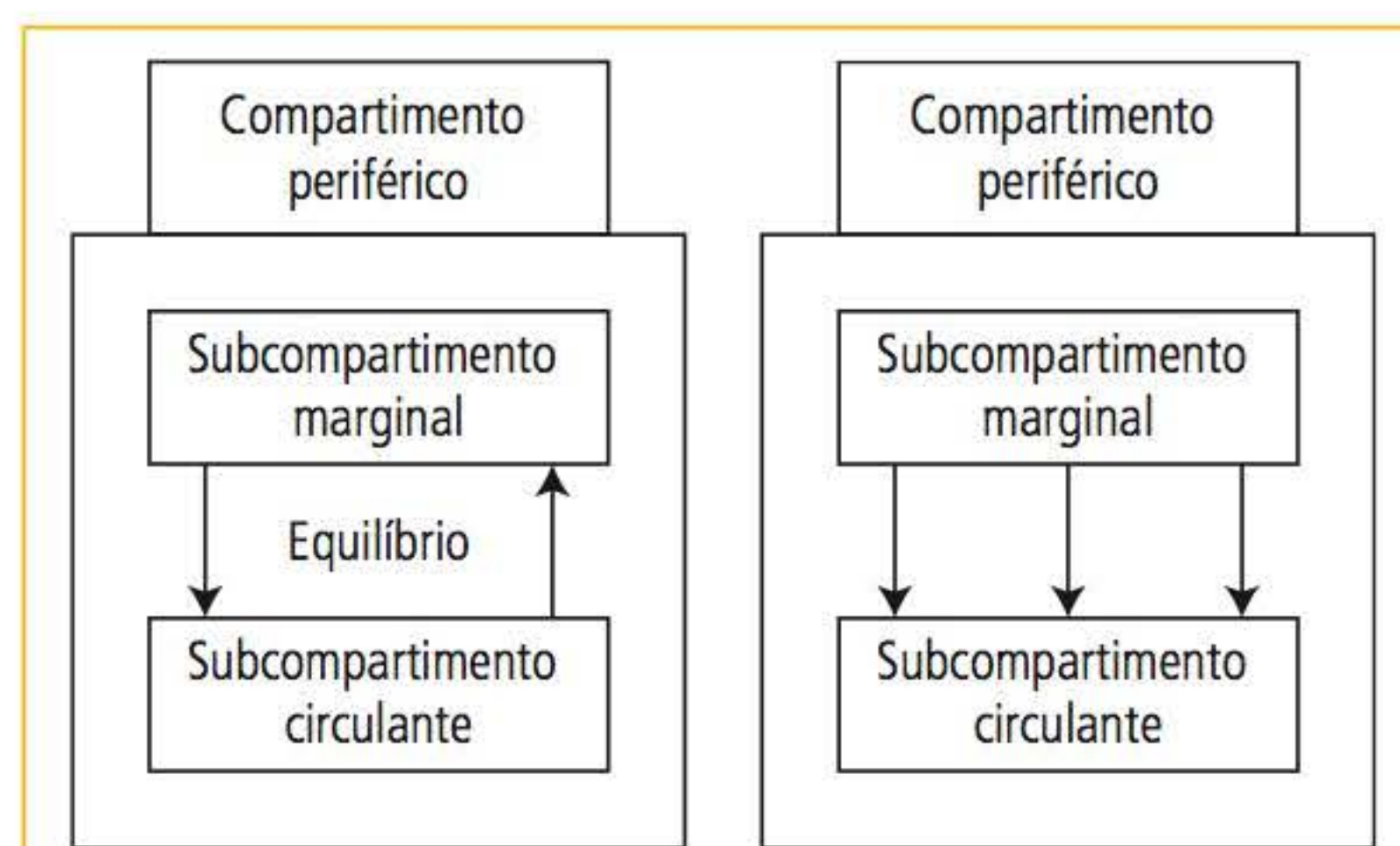


**FIGURA 8.17** Variação fisiológica dos neutrófilos.

Nos processos infecciosos ou inflamatórios agudos, há saída de células do compartimento pós-mitótico, que é o compartimento de reserva da medula óssea, onde a célula predominante é o bastonete. O aparecimento de bastões significa que o compartimento pós-mitótico está liberando células para o compartimento periférico. Nesses processos, o compartimento periférico pode aumentar de tamanho devido à saída “a maior” das células da medula óssea. Essa alteração pode ocorrer algumas horas após a instalação de um processo infeccioso ou inflamatório agudo.<sup>1,2</sup> Não se pode esquecer que, dependendo do momento em que for realizada a coleta do hemograma e do tempo de instalação do processo infeccioso ou inflamatório agudo, o leucograma pode mostrar leucocitose variável com neutrofilia e sem DNE. A **Figura 8.18** exemplifica essa situação.

Em uma situação em que a demanda tecidual por neutrófilos é muito grande, e a medula óssea não apresenta uma boa capacidade de resposta, situação geralmente encontrada em pessoas imunodeprimidas, idosos debilitados, pessoas com doença crônica, recém-nascidos e crianças, pode ocorrer uma neutropenia com DNE e o aparecimento de células mais jovens, como mielócitos e metamielócitos (precursores mielóides), os quais são muito difíceis de ser visualizados no sangue periférico.

Os neutrófilos, no compartimento periférico, circulam cerca de sete horas<sup>1,2</sup> e, após esse tempo,



**FIGURA 8.18** Aumento do compartimento periférico e do subcompartimento circulante em processos infecciosos e inflamatórios agudos.

migram para os tecidos, onde têm uma vida média de dois dias; uma vez nos tecidos, não retornam mais ao sangue periférico.<sup>1,2</sup> O tempo de maturação do estágio de mieloblasto até segmentado é de 96 a 144 horas ou de 4 a 6 dias.<sup>1,2</sup>

A segunda dificuldade na interpretação do leucograma é o tempo de meia-vida do neutrófilo no sangue periférico, que é muito curto. Isso resulta em uma renovação neutrofílica muito intensa. O número de neutrófilos que passa pelo sangue periférico é estimado em aproximadamente  $62 \text{ a } 400 \times 10^7 / \text{kg de peso/dia}$ .<sup>1,2</sup> O leucograma é como se fosse uma fotografia do momento da punção sanguínea, o que faz com que a sua interpretação seja diferente da do eritrograma, pois as células têm uma vida média de circulação de cerca de quatro meses e não horas, como as células brancas do tecido mieloide. Para a interpretação do eritrograma, é possível repetir-se a punção para a confirmação do resultado. Para o leucograma, a expressão “repetir a coleta para confirmação do resultado” não se aplica porque as células (neutrófilos) da punção anterior já migraram aos tecidos. A análise de vários leucogramas é que permite a compreensão do quadro leucocitário do paciente, que deve ser interpretado à luz da cinética dos neutrófilos. Sob condições de grande demanda tecidual, o tempo de maturação do neutrófilo pode ser reduzido a 48 horas. Nessa situação de mitose abreviada, a célula não tem tempo de fazer a maturação adequadamente, e formas jovens (bastonetes, metamielócitos e até células mais jovens) podem ser encontradas na corrente circulatória, muitas vezes acompanhadas de alterações leucocitárias como grânulações tóxicas e corpúsculos de Döhle.<sup>1,2</sup> Para a série branca, os



erros de mitose por demanda tecidual aumentada são o aparecimento de corpúsculos de Döhle e granulações tóxicas.

O neutrófilo é um granulócito e é a partir da liberação do conteúdo de seus grânulos que ele promove a morte e digestão bacteriana. Na sequência de maturação dos neutrófilos, os grânulos primários são visualizados nos estágios de pró-mielócito e mielócito; posteriormente, não são mais visualizados, sendo chamados também de grânulos inespecíficos ou azurrófilos.<sup>1,2</sup> Os grânulos primários contêm a mieloperoxidase (MPO), que catalisa a produção de hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), a partir de cloreto, e do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzidos a partir do metabolismo oxidativo, que é um bactericida eficaz e potente.<sup>1,2</sup> Contêm defensinas (proteínas catiônicas que destroem vários tipos de bactérias, fungos e vírus), lisozimas, proteínas que aumentam a permeabilidade bacteriana (BPI, do inglês *bactericidal permeability increasing protein*), azurocidina, elastase, catepsina, proteinases e esterases.<sup>1,2</sup>

Os grânulos secundários, também chamados de específicos, contêm lactoferrina (quela o átomo de ferro, indisponibilizando-o para o crescimento bacteriano), vitamina B<sub>8</sub>, ativadores do plasminogênio, collagenases (degradam o colágeno, aumentam o movimento ameboide através do tecido e têm participação na cicatrização), lisozimas e gelatinases.<sup>1,2</sup> Expressam na sua superfície CD11, CD18, CD24, CD66 e receptores para FMLP, C5a e citocromo b. O CD11 e o CD18 têm participação na adesão do leucócito ao endotélio durante a inflamação, na fagocitose e no metabolismo respiratório.<sup>1,2</sup> São visualizados no estágio de mielócito, metamielócito, bastonete e segmentado.

Os grânulos terciários são chamados de grânulos de gelatinase e contêm, além da gelatinase, receptor para FMLP e CD11.<sup>1,2</sup> Os grânulos quaternários, chamados de vesículas secretoras, estão distribuídos amplamente por toda a membrana citoplasmática, contêm fosfatase alcalina, albumina, citocromo b e receptores para complemento e FMLP.<sup>1,2</sup>

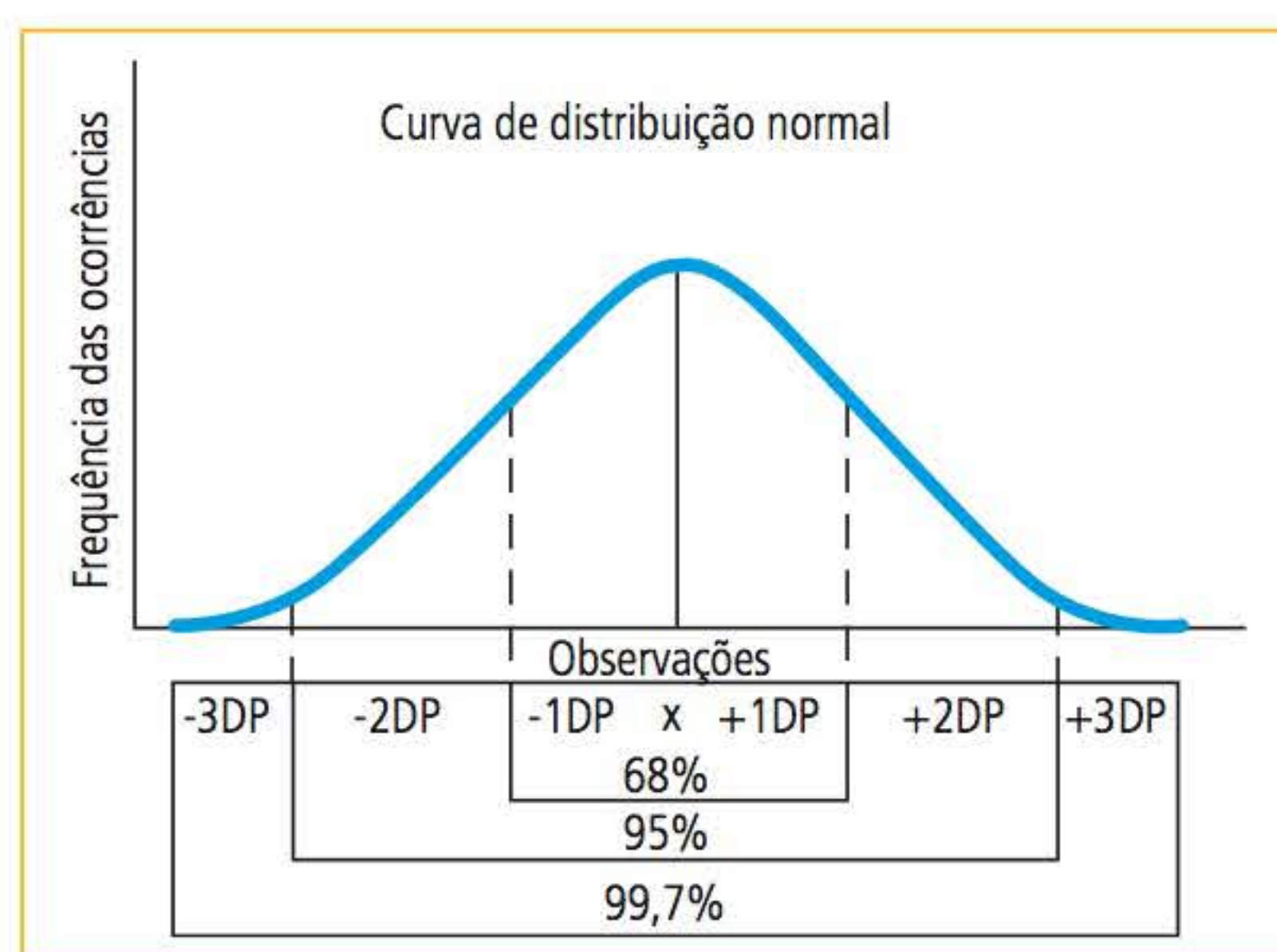
A granulação tóxica representa a visualização das granulações primárias em metamielócitos e neutrófilos (bastonetes + segmentados), células que, em situações fisiológicas, não têm essas granulações reveladas em decorrência do aumento da proliferação dos neutrófilos e abreviação da mitose.

Os corpúsculos de Döhle que podem acompanhar as granulações tóxicas são a visualização do retículo endoplasmático rugoso. O aparecimento de granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle pode ser correlacionado com infecção bacteriana grave. A presença de vacúolos citoplasmáticos nos neutrófilos podem indicar processo infeccioso bacteriano agudo, tendo seu significado como a visualização do processo de fagocitose celular.

Frente a um processo infeccioso, a resposta medular pode ser bastante intensa e apresentar uma leucocitose acima de 50.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$ . Esse quadro hematológico é chamado de reação leucemoide<sup>15</sup> (RL) e apresenta, além do desvio nuclear à esquerda, metamielócitos e mielócitos; em reações mais graves, podem ser visualizados pró-mielócitos e mieloblastos.<sup>15</sup> Esse quadro pode ser confundido com leucemia mieloide crônica (LMC) em fase crônica, recebendo, por esse motivo, nome de reação leucemoide. Pelo hemograma, eosinofilia, basofilia e plaquetas aumentadas indicam LMC; granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle, vacúolos citoplasmáticos e plaquetas normais ou diminuídas podem indicar RL. A prova da fosfatase alcalina pode fazer a distinção entre as duas situações. Uma prova com escore aumentado fala a favor de RL, com escore baixo ou zero, de LMC. A fosfatase alcalina aumenta nos grânulos dos neutrófilos quando esses estão ativados, o que ocorre quando existem processos infecciosos ou inflamatórios. Na LMC, a proliferação dos neutrófilos não se dá por estímulo de citocinas secretadas a partir do sítio inflamatório e sim por alteração clonal de uma célula-tronco. Nessa situação, o neutrófilo não está ativado e, por esse motivo, o escore da fosfatase alcalina é baixo. Outra maneira de se diferenciar laboratorialmente um quadro de RL de LMC é a realização do cariótipo com a pesquisa do cromossomo Philadelphia, que estará ausente na RL e presente na LMC. A biologia molecular também pode fazer essa distinção com a pesquisa do gene quimérico *BCR-ABL*, presente na LMC.

A terceira dificuldade em interpretar o leucograma está no valor de referência. De modo geral, esses valores variam entre 4.000 a 11.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$  e são obtidos a partir de uma população normal. A distribuição desses valores segue uma curva de distribuição normal. A **Figura 8.19** mostra a distribuição dos valores de referência na curva de distribuição normal.





**FIGURA 8.19** Distribuição dos valores de referência na curva de distribuição normal.

DP, desvio padrão.

O valor de referência mais baixo (4.000) está plotado em menos 2 desvios-padrão, e o valor mais alto (11.000) em mais 2 desvios-padrão; esse intervalo representa 95% da população. Dessa população, 5% estão fora dos valores de referência, mas são normais; isso significa que se pode ter pacientes com menos de 4.000 ou mais de 11.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$  que sejam normais. Valores abaixo de 4.000 leucócitos não representam, necessariamente, um quadro de leucopenia, como valores acima de 11.000 não representam, necessariamente, leucocitose. Valores abaixo de 2.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$  devem ser encarados como leucopenia, assim como valores acima de 13.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$  devem ser encarados como leucocitose. Um indivíduo pode ter como valor constitucional de leucócitos uma variação de cerca de 5.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$ . Caso essa mesma pessoa apresente um valor de 9.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$ , terá uma leucocitose, porque seu número basal de leucócitos quase dobrou e, na interpretação clínica, não há leucocitose. O inverso também é verdadeiro: caso o indivíduo tenha como valor basal de 9.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$  e apresente uma contagem leucocitária de 4.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$ , haverá um quadro de leucopenia que não será levado em conta na interpretação clínica. A leucocitose ou leucopenia, quando os valores leucocitários estão dentro da referência, são de difícil interpretação clínica, mas, na interpretação laboratorial, esse fato não pode ser esquecido. Portanto, deve-se sempre analisar o leucograma como um todo e sempre pelo valor absoluto, não pelo valor relativo; a única célula que é interpretada pelo valor relativo é o número de bastonetes. Reforça-se mais uma vez a necessidade de

leucogramas de controle na interpretação da instalação de um quadro infeccioso agudo.

A quarta dificuldade na interpretação do leucograma é saber se houve variação significativa, para mais ou para menos, entre duas contagens de leucócitos de amostras coletadas em tempos distintos. Um paciente teve um resultado de leucócitos de 13.000; em uma segunda coleta, a contagem de leucócitos foi de 15.000. Estatisticamente, a contagem de leucócitos é a mesma ou não houve variação significativa entre as duas contagens? Para responder a essa questão, deve ser aplicada a equação que está descrita no Capítulo 4, Controle de qualidade em hematologia, no tópico Como saber se um resultado realmente difere do outro.

A cinética dos neutrófilos é estimulada por fatores de crescimento e por citocinas produzidas por células da medula óssea e dos tecidos. O fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a interleucina-1 (IL-1) retardam o processo de apoptose e, em situações de processos infecciosos agudos, aumentam a sobrevivência dos neutrófilos nos tecidos.<sup>1,2</sup> Os fatores de crescimento e as citocinas desempenham um papel fundamental no controle da produção leucocitária.<sup>1,2</sup> A **Tabela 8.4** mostra os fatores de crescimento, qual a célula estimulada por cada fator e o local de produção.

O G-CSF aumenta a expressão do CD11b, uma integrina que promove a adesão dos neutrófilos à célula endotelial e favorece a diapedese. Também aumenta a afinidade ao CD62L, uma L-selectina que é expressa na célula endotelial.<sup>1,2</sup> Os fatores de crescimento também fazem a ativação dos neutrófilos, levando à produção de superóxido, em resposta a produtos bacterianos, como o FMLP (N-formil-metil-leucina-fenilalanina).<sup>1,2</sup> Outros fatores de crescimento, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  e  $\beta$  (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), as interleucinas (IL-1, 6 e 8) e as frações do complemento (C5a), induzem a liberação de leucócitos pela medula óssea.<sup>1,2</sup>

A quinta dificuldade na interpretação do leucograma é que, durante o curso de um processo infeccioso bacteriano agudo, pode haver mudança de um quadro em que a produção é maior que o consumo para um quadro em que a produção é menor que o consumo ou vice-versa. Isso está na dependência da evolução clínica do paciente, que será discutida a seguir nas causas de neutrofilia.



TABELA 8.4 Células estimuladas pelo fator de crescimento e o local de produção

FATOR DE CRESCIMENTO	CÉLULA ESTIMULADA	LOCAL DE PRODUÇÃO
Fator estimulante de colônias de macrófagos (CSF-1)	Monócito, macrófago	Células endoteliais, monócitos, macrófagos e fibroblastos
Fator estimulante de colônias para granulócitos e macrófagos (GM-CSF)	Granulócitos, megacariócitos, eritrócitos, células-tronco e blastos leucêmicos	Linfócitos T, células endoteliais e fibroblastos
Fator estimulante de colônias para granulócitos (G-CSF)	Granulócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e blastos leucêmicos	Células endoteliais, placenta, monócitos e macrófagos
Interleucina-3	Granulócitos, células eritroides, células-tronco e blastos leucêmicos	Linfócitos T
Interleucina-4	Linfócitos T e B	Linfócitos T
Interleucina-5	Linfócitos B	Linfócitos T
Interleucina-6	Linfócitos B, linfócitos T, unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (CFU-GEMM), unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) e macrófagos	Fibroblastos, leucócitos e células endoteliais
Interleucina-7	Linfócitos B	Leucócitos
Interleucina-8	Linfócitos T e neutrófilos	Leucócitos
Interleucina-9	CFU-GEMM	Linfócitos
Interleucina-11	Linfócitos T, linfócitos B, CFU-GEMM e macrófagos	Macrófagos

CINÉTICA DOS MONÓCITOS E O SISTEMA FAGOCITÁRIO MONONUCLEAR

O sistema mononuclear fagocitário, anteriormente chamado de sistema reticuloendotelial, é composto pelos monoblastos, pró-monócitos, monócitos e macrófagos. Tem como função a remoção de células mortas, senescentes, estranhas ou alteradas, remoção de partículas estranhas, regulação da função de outras células, processamento e apresentação de antígenos nas reações imunológicas e participação em reações inflamatórias agudas e crônicas. Tem também um papel importante na formação da placa de ateroma e na destruição tanto de microrganismos como de células neoplásicas e de enxertos.<sup>1,2</sup>

O principal sítio de produção dos mononucleares é a medula óssea. A proliferação e a diferenciação da célula mieloide comprometida com a linhagem dos mononucleares se dão de monoblasto a monócito, passando pela fase intermediária de pró-monócito; a diferenciação a macrófago ocorre nos tecidos.<sup>1,2</sup> Os fatores de crescimento G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos), M-CSF (fator estimulante de colônias de monócitos e macrófagos), GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e interleucina-3 (IL-3) são os responsáveis pela proliferação e diferenciação

dos mononucleares.<sup>1,2</sup> Os mononucleares, na medula óssea, estão divididos em compartimento mitótico e compartimento pós-mitótico: o primeiro é composto pelos monoblastos e pró-monócitos, e o segundo, pelos monócitos.<sup>1,2</sup> O monócito, no sangue periférico, é considerado uma célula intermediária que adquire sua maturidade funcional nos tecidos como macrófago.<sup>1,2</sup> Quando o monócito sai da medula óssea e entra no sangue periférico, ele tem dois caminhos: ou ele fica no compartimento marginal (aderido às células endoteliais) ou no compartimento circulante.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.20** exemplifica a cinética dos monócitos.

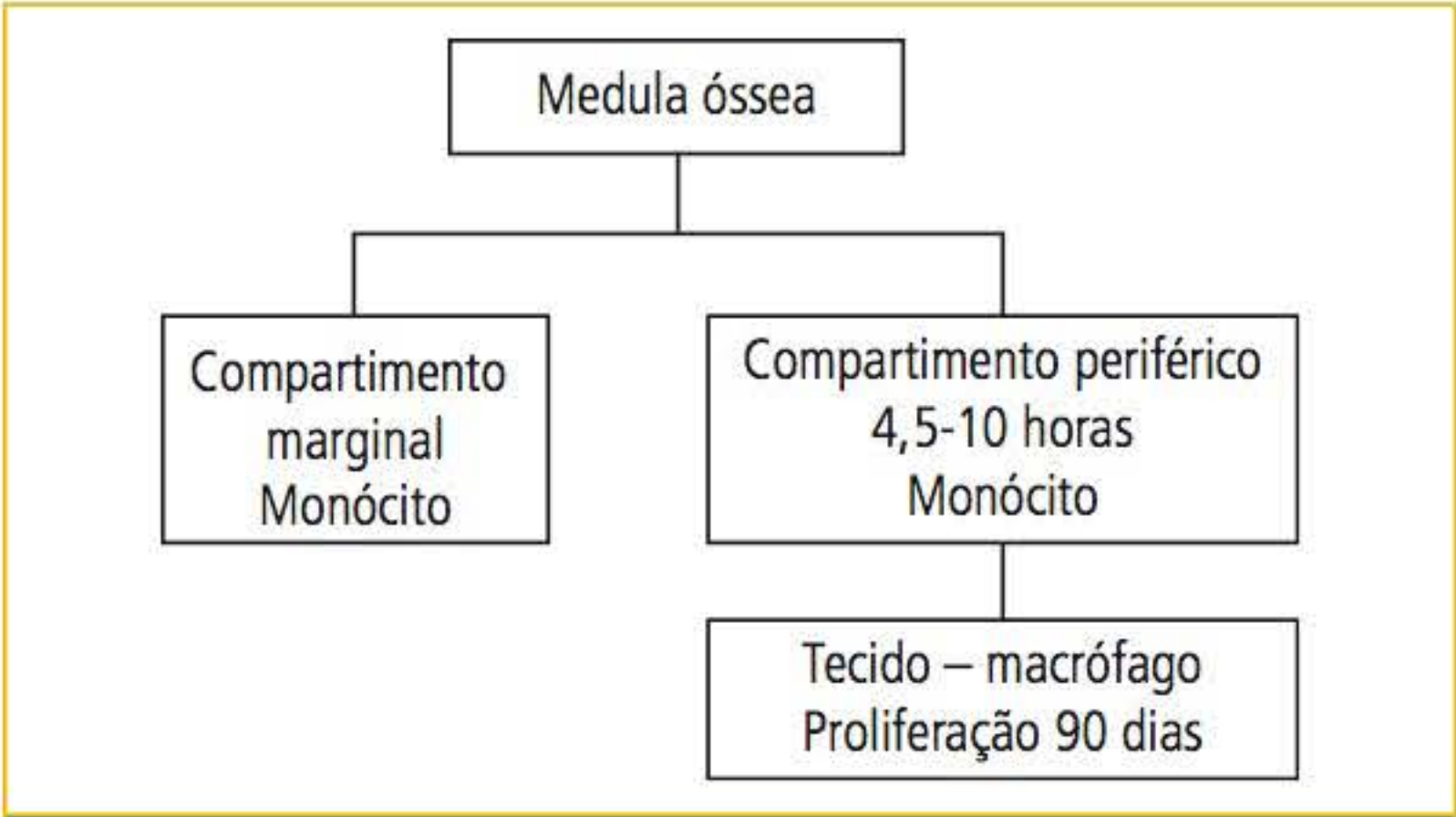


FIGURA 8.20 Cinética dos monócitos.

O compartimento dos monócitos na medula óssea possui aproximadamente de  $600 \times 10^6$  monó-



bitos/Kg de peso, o sangue periférico possui cerca de 80×10 monócitos/Kg de peso.<sup>1,2</sup> Os monócitos circulam entre 4,5 a 10 horas, em um tempo médio de aproximadamente oito horas, e a entrada e a saída de monócitos no sistema vascular são de aproximadamente 7×10<sup>6</sup> monócitos/Kg/hora.<sup>1,2</sup> O monócito, nos tecidos, diferencia-se em macrófago e torna-se residente. Quando ativado, exerce sua função e tem capacidade de proliferar.<sup>1,2</sup> Os macrófagos estão presentes em vários tipos de tecidos e órgãos: 56% do total dos macrófagos estão no fígado, 15% nos pulmões, 8% no peritônio e o restante distribui-se nos demais órgãos (baço, rim, linfonodos, gônadas e sistema nervoso central, entre outros).<sup>1,2</sup> O fato de o macrófago proliferar no tecido é importante porque, quando a demanda tecidual por macrófagos aumenta, ele pode proliferar e não haver aumento de monócitos no leucograma. A **Figura 8.21** traz fotografias de monócitos e macrófagos.

No baço, os macrófagos estão presentes tanto na polpa branca como na polpa vermelha. Na polpa vermelha, estão presentes em grande número e têm a função de fagocitar eritrócitos senescentes ou alterados; na polpa branca, estão em menor número, localizados nos centros germinativos, e a principal função é o processamento e a apresentação de antígenos na resposta imunológica.<sup>1,2</sup>

No tecido hepático, recebem a denominação de células de Kupffer; posicionam-se ao longo das paredes dos sinusoides hepáticos e fagocitam partículas provenientes do sangue periférico, como lipossomos, bactérias, parasitas, vírus, eritrócitos alterados, fibrina e produtos de degradação do fibrinogênio e/ou fibrina.<sup>1,2</sup> Produzem interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) e podem alterar a função do hepatócito.<sup>1,2</sup>

Na medula óssea, onde também são chamados de células reticulares, compõem o microambiente da medula óssea e regulam a liberação das células do estroma para os sinusoides.<sup>1,2</sup> Ao contrário dos

macrófagos do baço e do fígado, os macrófagos da medula óssea são fagócitos facultativos.<sup>1,2</sup>

RECEPTORES DOS MACRÓFAGOS

A membrana citoplasmática dos macrófagos possui vários receptores que estão relacionados com a função celular. Os macrófagos têm receptores para imunoglobulinas cuja função está relacionada com a fagocitose, com a secreção de proteínas, enzimas e com a geração de produtos reativos a partir do metabolismo do oxigênio e nitrogênio.<sup>1,2</sup> O **Quadro 8.2** mostra os receptores para imunoglobulinas presentes nos macrófagos.<sup>1,2</sup>

QUADRO 8.2 Receptores para imunoglobulinas presentes nos macrófagos	
RECEPTORES	COMENTÁRIOS
IgG FcγRI (CD64)	Tem ação na fagocitose e no metabolismo respiratório oxidativo. Também está expresso em neutrófilos
IgG FcγRII (CD32)	Tem ação na fagocitose e no metabolismo oxidativo. Também está expresso em neutrófilos, linfócitos B e linfócitos NK
IgG FcγRIII (CD16)	Tem ação na fagocitose. Também está expresso em linfócitos NK e neutrófilos
IgE FcγRII (CD23)	Está envolvido com as reações alérgicas. Também está expresso em linfócitos NK, eosinófilos e plaquetas
IgA FcαR	A ligação desse receptor com complexos de IgA induz uma série de respostas, como geração de superóxidos, liberação de mediadores inflamatórios e fagocitose e a destruição de vários microrganismos patogênicos. Também está expresso em neutrófilos, eosinófilos, eritrócitos e linfócitos T e B

Os macrófagos também possuem receptores para complemento, como o CR1 (CD 35) e o CR3 (CD11/CD18). O CD35 aumenta a atividade

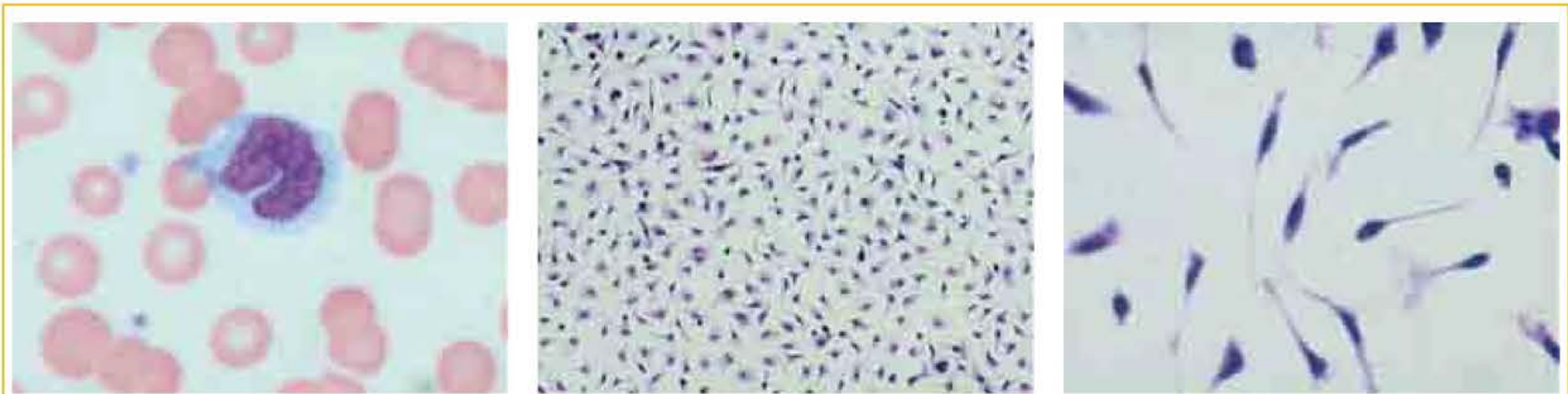


FIGURA 8.21 Monócitos e macrófagos.



fagocitária, e o CR3, além de aumentar a atividade fagocitária, promove a adesão ao endotélio durante o processo inflamatório.<sup>1,2</sup> A perda desses receptores pode predispor o paciente a infecções bacterianas recorrentes.<sup>1,2</sup> Também possuem receptores para a  $\alpha_2$ -macroglobulina, que pode se unir a vários fatores de crescimento, citocinas, hormônios, antígenos, proteínas bacterianas, fatores inibidores de leucemias e fator de necrose tumoral.<sup>1,2</sup> Possui receptores para proteínas glicosiladas, como manose e fucose.<sup>1,2</sup> Possui receptor para a transferrina<sup>1,2</sup> podendo, desse modo, internalizar o átomo de ferro como ferro de depósito. Possui receptor para o fator de necrose tumoral (TNF), que induz a proliferação celular, diferenciação e morte apoptótica.<sup>1,2</sup> O CD40, o CD27, o CD30 e o CD95 são receptores para o TNF.<sup>1,2</sup> O CD40 está envolvido com a ativação de linfócitos T e B. O CD27 é um ligante para o CD70 que está envolvido na interação celular entre linfócitos T e B, proliferação do linfócito T e secreção de citocinas. O CD30, também expresso em células T e B ativadas e células de Reed-Sternberg (linfoma de Hodgkin), está envolvido com a ativação, proliferação, diferenciação e morte celular. O CD95 está correlacionado com a ativação do sinal apoptótico e indução da morte celular. Os macrófagos também possuem receptores para fatores de coagulação, como fator VII, VII ativado, fibrinogênio, trombina, fator X, X ativado, ativadores do plasminogênio e receptores para o fator tissular (fator III).<sup>1,2</sup> Têm receptores para fatores quimiotáticos, como FMLP (formil-metionina-leucina-fenilalanina), que induz o movimento ameboide e a liberação de lisozimas e superóxido.<sup>1,2</sup> Têm receptor para CD4, pelo qual o vírus HIV o invade e torna-o seu reservatório.<sup>1,2</sup> Os macrófagos possuem receptores para a lactoferrina, que possibilitam ao macrófago internalizar o complexo ferro-lactoferrina, não disponibilizando o ferro para o crescimento bacteriano.<sup>1,2</sup> Possuem, também, receptores para lipoproteínas, podendo internalizar o LDL-colesterol e contribuindo para a geração da placa de ateroma.<sup>1,2</sup>

### CINÉTICA DOS EOSINÓFILOS

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea a partir da célula-tronco comprometida com a linhagem mielóide. No estágio de mieloblasto e pró-mielócito, os granulócitos não são diferenciados, morfológicamente, entre si. A partir do estágio de

mielócito, quando se inicia a produção das granulações secundárias, os eosinófilos podem ser distinguidos dos neutrófilos e basófilos.<sup>1,2</sup> A proliferação e a diferenciação dos eosinófilos acontecem a partir de três fatores de crescimento: interleucina-3 (IL-3), interleucina-5 (IL-5) e do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).<sup>1,2</sup> A IL-3 e o GM-CSF estimulam todos os granulócitos, não sendo, portanto, específicos para os eosinófilos. A IL-5 é fundamental para a proliferação, diferenciação e função dos eosinófilos.<sup>1,2</sup>

Os eosinófilos maduros circulam cerca de 18 horas,<sup>15</sup> migrando posteriormente para os tecidos onde são encontrados, em condições fisiológicas, na pele,<sup>1,2</sup> no trato gastrointestinal (exceto no esôfago),<sup>16</sup> na mucosa do trato respiratório,<sup>1,2</sup> no trato reprodutivo feminino<sup>16</sup> e na glândula mamária.<sup>16</sup>

Os grânulos específicos dos eosinófilos são ricos em uma proteína chamada de *major basic protein* (MPB), rica em arginina e com grande afinidade por moléculas ácidas. Os grânulos específicos também são ricos em peroxidase e íons halógenos.<sup>1,2</sup>

As causas de eosinofilia podem ser divididas em dois modos;<sup>16</sup> eosinofilia mediada por citocinas, que aumentam a proliferação e sobrevivência do eosinófilo e são chamadas de eosinofilias extrínsecas, e as eosinofilias intrínsecas, que são mutações que levam à expansão clonal e que se caracterizam por serem doenças hematológicas com envolvimento da linhagem eosinofílica.<sup>16</sup> As extrínsecas são reativas; outras células produzem citocinas (IL-3, IL-5 e GM-CSF) que ativam os eosinófilos e seus precursores.<sup>16</sup> As doenças intrínsecas são representadas por doenças como leucemia eosinofílica crônica (LEC), leucemia mieloide crônica (LMC) associada com eosinofilia, policitemia vera (a mutação JAK-2 aumenta a secreção de IL-5), síndromes mielodisplásicas (pode ocorrer eosinofilia), trombocitemia essencial, metaplasia mieloide e síndrome da hipereosinofilia.<sup>16</sup> A síndrome da hipereosinofilia é uma eosinofilia idiopática, e vários pacientes com essa síndrome são responsivos ao imatinibe, mas não apresentam rearranjos genéticos. Atualmente, esses pacientes são considerados como tendo uma LMC ou LEC;<sup>16</sup> geralmente o número de leucócitos está entre 10.000 e 30.000/ $\mu$ L com o número de eosinófilos variando entre 30 a 70%.<sup>15</sup>

As eosinofilias extrínsecas são representadas por parasitoses, doenças alérgicas, infecciosas, doença do enxerto contra hospedeiro, doenças



inflamatórias clonais de células T, doenças induzidas por drogas, tumores com origem em células hematopoiéticas e tumores sólidos.<sup>16</sup>

Rinoconjuntivite, asma brônquica, esofagite eosinofílica, dermatite atópica e, em crianças, a alergia alimentar e a colite alérgica são doenças alérgicas comuns<sup>16</sup> e têm como característica, na maioria dos pacientes, eosinofilia no sangue e nos tecidos.<sup>16</sup> A eosinofilia com consequente produção de IgE ocorre porque o alérgeno ativa os linfócitos T CD4+, especificamente a subpopulação TH<sub>2</sub>, que estimula a produção de anticorpos pelo linfócito B, os quais produzem uma grande quantidade de citocinas, entre elas a IL-5, fazendo com que a diferenciação, proliferação, ativação e sobrevivência eosinofílica aumentem.<sup>16</sup> Os eosinófilos contribuem no processo inflamatório porque, quando fazem a degranulação, causam um dano tissular com subsequente disfunção do órgão afetado,<sup>16</sup> pois apresentam um potencial oxidativo grande pelo fato de seus grânulos serem ricos em NADPH oxidase e por produzirem radicais livres e íons halógenos.<sup>24,26</sup> Apesar da capacidade de fagocitose e de seu potencial oxidativo, a destruição de bactérias não é a principal função do eosinófilo. A principal função é a modulação das reações de hipersensibilidade pela ação de aminas oxidativas e de histaminases.<sup>1,2</sup> Quando ocorre ativação dos linfócitos T (CD4+ TH<sub>2</sub>), além da ativação dos eosinófilos, ocorre ativação das células endoteliais com expressão, na superfície celular, de E-selectinas<sup>1,2</sup> e moléculas de adesão intercelular (ICAM-1 e VCAM-2).<sup>1,2</sup> Os eosinófilos apresentam, em sua membrana citoplasmática, receptores para essas moléculas adesivas (antígeno Lewis para E-selectinas, CD11b/CD18 para ICAM-1 e integrinas para VCAM-1).<sup>1,2</sup> Após a ligação com a célula endotelial, eles passam ao tecido e migram para o sítio inflamatório.<sup>1,2</sup> Os receptores para moléculas VCAM só se expressam em eosinófilos.<sup>15</sup> Os eosinófilos têm receptores para a região Fc das imunoglobulinas dos tipos IgG e IgE, para as frações do complemento C3b/C4b (CR 1), iC3b (CR 3) e C5a e para IgA, sendo específico para sítios inflamatórios secretores, como os tratos respiratório, gastrointestinal ou geniturinário.<sup>1,2</sup>

Os parasitas que causam eosinofilia são aqueles que induzem uma resposta inflamatória com aumento da subpopulação TH<sub>2</sub> com consequente eosinofilia e aumento de IgE.<sup>16</sup> Os eosinófilos têm grande afinidade pelos anticorpos do tipo IgE que

recobrem os parasitas e, ao se ligarem a esses anticorpos, fazem a degranulação com liberação de proteínas citotóxicas.<sup>1,2</sup> Os parasitas que frequentemente causam eosinofilia são *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia sp.*, *Schistosoma mansoni* e *Toxocara canis*. A eosinofilia pode ser encontrada na malária por *Plasmodium falciparum*.<sup>1,2</sup> Como o eosinófilo possui receptor para LPS (lipopolissacarídeo = endotoxina bacteriana), ele pode ter uma participação na imunidade antibacteriana, apesar de a associação de eosinofilia com infecções bacterianas não ser comum.<sup>16</sup> Nos processos infecciosos virais, a eosinofilia não é um achado hematológico comum; no entanto, em processos virais com envolvimento específico de células TH<sub>2</sub>, a eosinofilia pode ocorrer, o que explica por que infecções virais do trato respiratório são uma causa importante de exacerbação de asma brônquica.<sup>16</sup>

A eosinofilia tem sido observada na doença do enxerto contra o hospedeiro, principalmente nos quadros crônicos gastrintestinais e cutâneos.<sup>16</sup>

A eosinofilia é um achado característico das reações de hipersensibilidade mediada por medicamentos. As drogas associadas à eosinofilia são anticonvulsivantes (carbamazepina, fenobarbital, fenitoína, primidona, lamotrigina, ácido valproico, gabapentina e benzodiazepínicos), antineoplásicos (alopurinol), antimicrobianos (minociclina, terbinafina, nitrofurantoína, isoniazida e abacavir), sulfas (sulfonamida, dapsona e sulfasalazina), anti-inflamatórios (oxicam e talidomida), anti-hipertensivos (captopril e diltiazem) e anti-diabéticos (sorbinitil).<sup>16</sup> Fumantes podem apresentar eosinofilia.<sup>1,2</sup>

A eosinofilia tecidual e sanguínea está associada com o linfoma de Hodgkin, linfoma cutâneo de célula T e síndrome de Sézary.<sup>16</sup> A eosinofilia, nessas patologias, está associada ao aumento da produção de IL-5.<sup>16</sup> A eosinofilia sanguínea e tecidual também foi observada em pacientes com tumores de origem epitelial, como da glândula tireoide, estômago, fígado e bexiga; não se sabe a causa da eosinofilia ou a função dos eosinófilos nessas doenças.<sup>16</sup>

A eosinopenia é difícil de avaliar quando se faz a contagem diferencial pelo método manual. Quando a contagem diferencial é realizada por aparelhos que fazem a contagem em cinco partes, é possível detectar a eosinopenia. A eosinopenia é um achado característico nas infecções bacterianas



agudas. A correlação entre eosinopenia e processo infeccioso bacteriano agudo não tem uma explicação. Pode ser devido a uma combinação de fatores, como sequestro, marginação e quimiotaxia. O reaparecimento de eosinófilos no sangue periférico geralmente é um sinal de melhora do processo infeccioso bacteriano agudo.

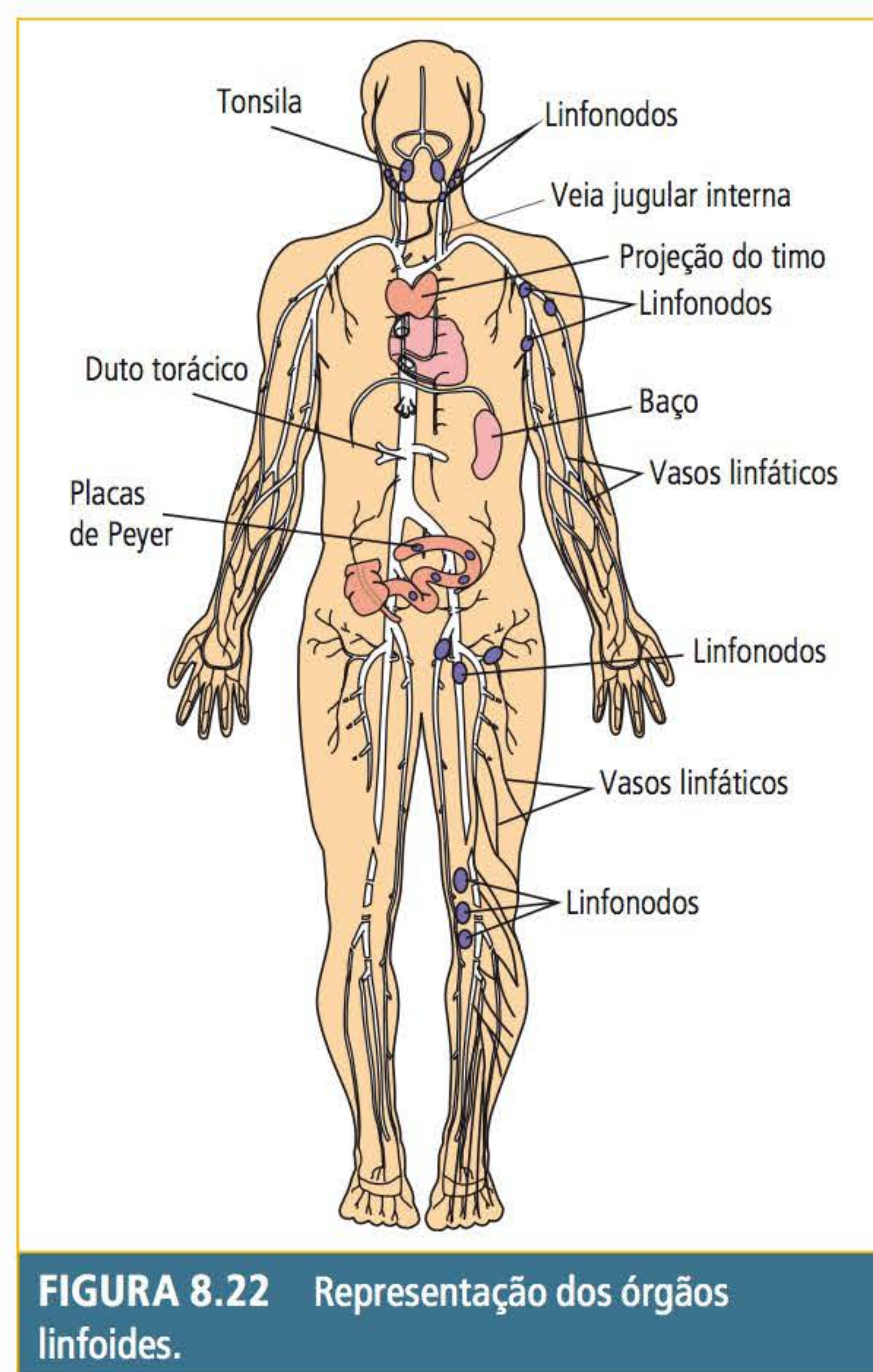
### CINÉTICA DOS BASÓFILOS

Os basófilos e os mastócitos são células semelhantes, tanto em morfologia como pela alta afinidade por anticorpos do tipo IgE, sendo derivados da célula-tronco comprometida com a linhagem mieloide.<sup>15</sup> Os basófilos fazem toda a sua maturação na medula óssea, passam ao sangue periférico e, posteriormente, migram para os tecidos, enquanto os mastócitos migram aos tecidos quando ainda são imaturos e neles se diferenciam.<sup>15</sup> Os basófilos e os mastócitos são ricos em histamina e estão envolvidos com o início e a propagação dos processos inflamatórios e alérgicos.<sup>15</sup> O basófilo está envolvido nas reações de hipersensibilidade imediata, como asma, urticária, rinite alérgica e reação anafilática.<sup>15</sup> O principal estímulo para a ativação dos basófilos são os anticorpos IgE. Eles também são estimulados pela IL-3, frações do complemento (C5a), fator estimulador de colônias de granulócitos, veneno de insetos, determinados alimentos,<sup>6</sup> alguns medicamentos (manitol, contrastes e relaxantes musculares) e macrófagos e pela FMLP (formil-metionina-leucina-fenilalanina).<sup>15</sup> O basófilo ativado secreta histamina, leucotrienos, IL-4 e IL-13.<sup>17</sup> A histamina é considerada um mediador que causa os sintomas agudos do processo alérgico. A IL-4 aumenta a secreção de mediadores pró-inflamatórios e várias citocinas pelos mastócitos.<sup>2</sup> A IL-13 aumenta a produção de IgE e a expressão do receptor para a IgE no basófilo.<sup>18</sup> A basofilia pode ser encontrada em reações de hipersensibilidade associadas com IgE, na colite ulcerativa, na artrite reumatoide juvenil e em pessoas expostas à radiação ionizante.<sup>8</sup> A basofilia também é encontrada nas doenças mieloproliferativas, como policitemia vera, mielofibrose, trombocitemia essencial e leucemia mieloide crônica; nessa última, a basofilia pode ser considerada como indicador de mudança de fase.<sup>8</sup>

### CINÉTICA DOS LINFÓCITOS

O sistema linfático começa a se desenvolver no final da quinta semana de gestação, após os primórdios

do sistema vascular tornarem-se reconhecidos, e está constituído pelos órgãos linfáticos primários e secundários.<sup>1,2</sup> Os órgãos linfáticos primários são o timo e a medula óssea: o primeiro está envolvido com a proliferação e diferenciação dos linfócitos T, e o segundo, com a proliferação e diferenciação dos linfócitos B. Os órgãos linfoides secundários são baço, linfonodos, placas de Peyer e amígdalas.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.22** traz uma representação dos órgãos linfoides.



**FIGURA 8.22** Representação dos órgãos linfoides.

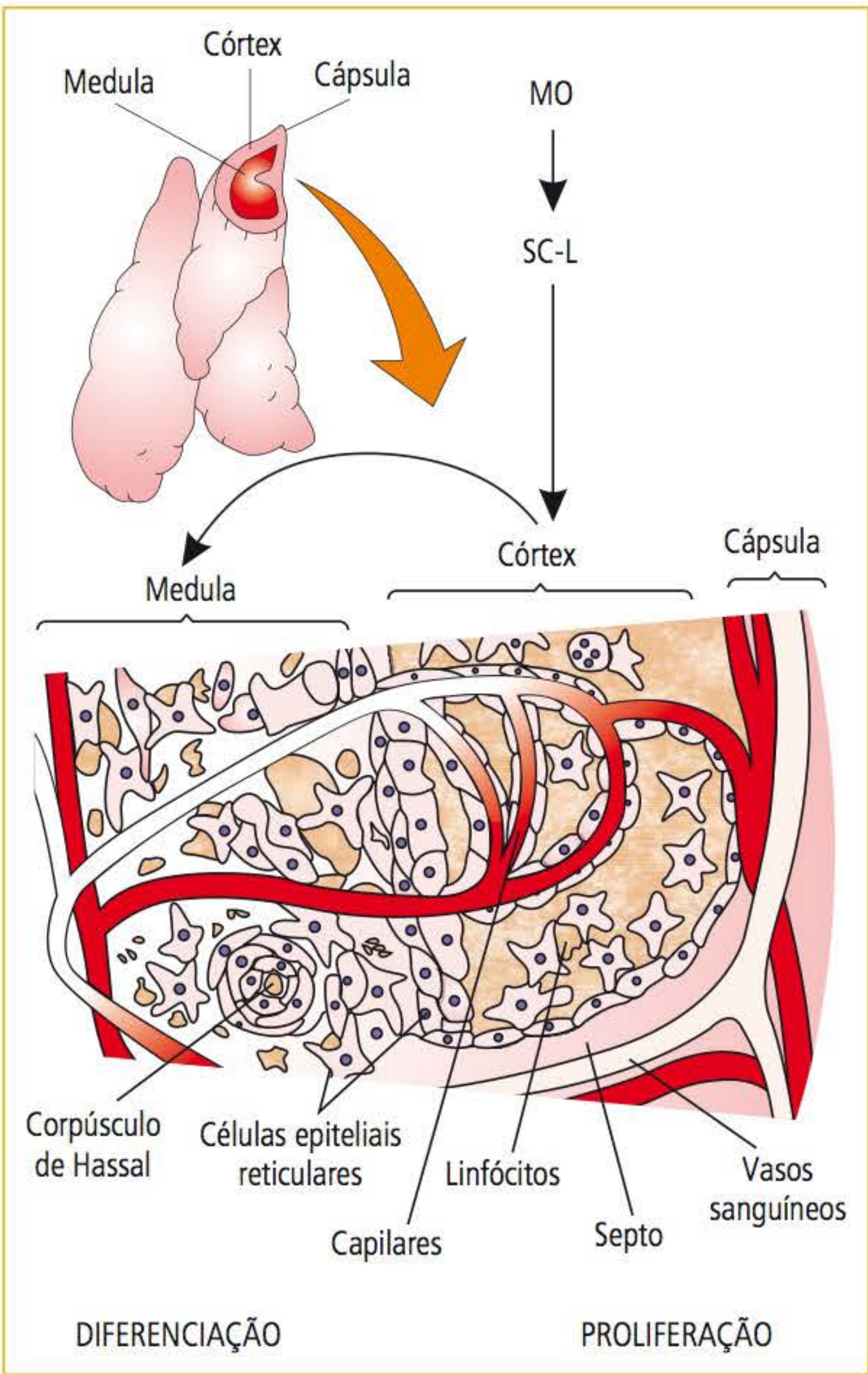
O sistema linfático distribui-se por todo o organismo e tem a função de recolher o líquido tecidual que não retornou aos capilares sanguíneos; esse líquido é filtrado e retorna ao sistema circulatório.<sup>19</sup> O sistema linfático inicia em fundo de saco e nas extremidades, e sua circulação se faz em direção ao coração. Os capilares linfáticos das extremidades vão-se unindo e formando os vasos linfáticos, que se anastomosam em dois grandes ductos: o torácico e o linfático.<sup>19</sup> O primeiro recebe os vasos linfáticos provenientes dos membros inferiores, do lado esquerdo da cabeça, do braço esquerdo e de parte do tórax; o segundo do lado direito da cabeça, do braço direito e de parte do



tórax.<sup>19</sup> Esses dutos linfáticos desembocam na veia jugular interna.<sup>1,2</sup> As células presentes na linfa, em situações fisiológicas, são os linfócitos.

**⇨ DIFERENCIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T – TIMO**

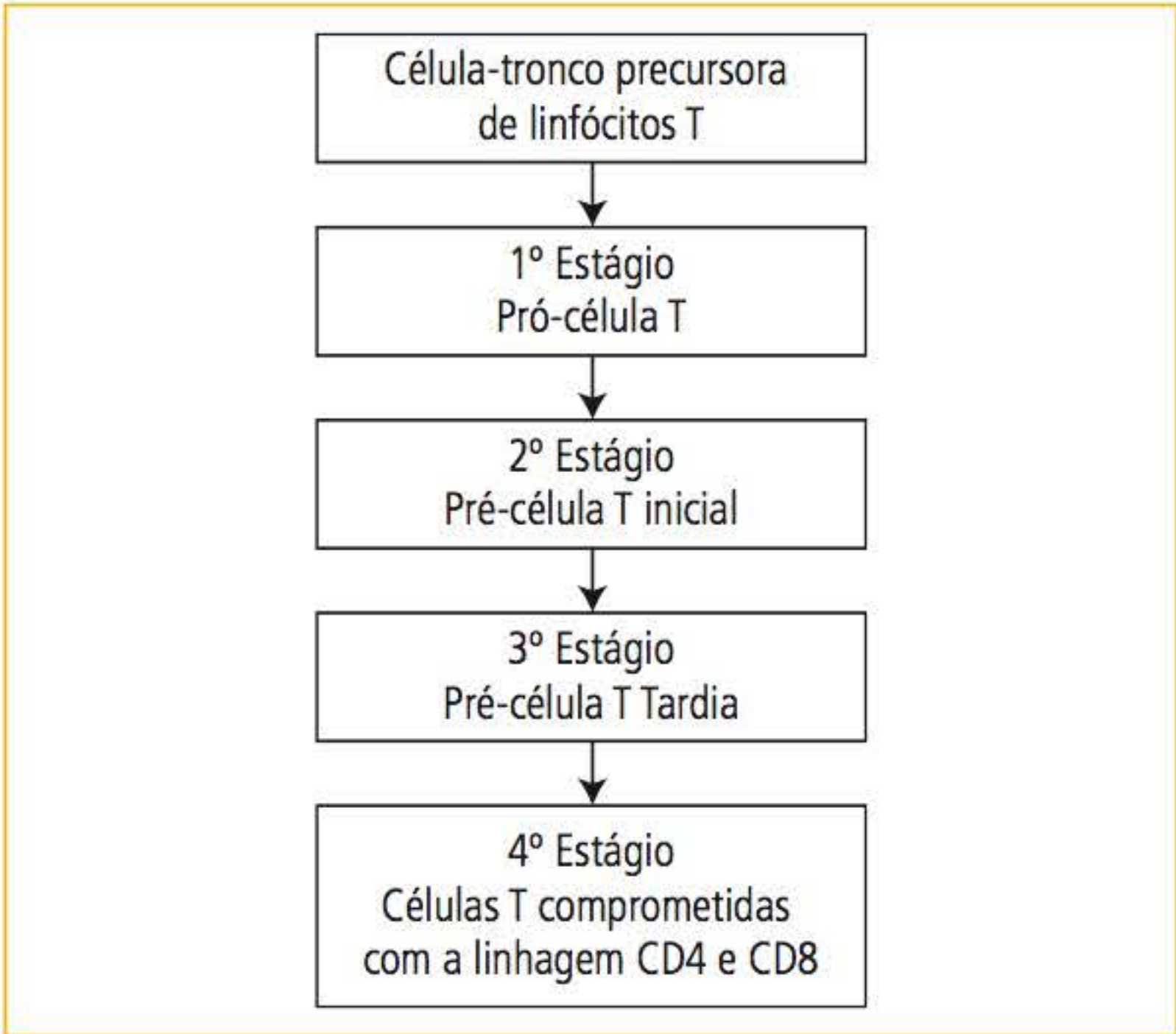
O timo é um órgão linfoepitelial situado no mediastino. Atinge seu desenvolvimento máximo no feto e no recém-nascido, cresce até a puberdade, quando inicia um processo de involução.<sup>1,2</sup> O timo é recoberto por uma cápsula fibrosa, a partir da qual fibras chamadas de trabéculas dividem-no em dois lóbulos.<sup>1,2</sup> Os lóbulos apresentam duas regiões: a periférica, chamada de córtex, e a outra, mais central, denominada medula. Veias e artérias penetram o córtex e a medula do timo. Células epiteliais, no córtex, se desenvolvem juntas às artérias e veias e impedem a passagem dos linfócitos do córtex para a medula, fazendo uma barreira chamada de hematotímica. A **Figura 8.23** esquematiza o timo mostrando o fluxo sanguíneo.



**FIGURA 8.23** Esquema e fluxo sanguíneo do timo.

As células-tronco comprometidas com a linhagem linfóide ganham a corrente circulatória

e, seletivamente, migram ao timo e instalam-se no córtex, onde há um predomínio de linfócitos em relação às células dendríticas.<sup>1,2</sup> As células dendríticas fazem uma interação célula a célula com os linfócitos, formando um complexo linfoepitelial chamado de *nurse cells*.<sup>1,2</sup> Essa interação, regulada pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade, tem como função fazer a proliferação e a diferenciação dos linfócitos T.<sup>1,2</sup> Quando os linfócitos T atingem um determinado grau de diferenciação, eles passam à medula do timo, que, além dos linfócitos, também tem células epiteliais, chamadas de células epiteliais escamosas.<sup>1,2</sup> Essas células dão origem aos corpúsculos de Hassal, que têm a função, junto com as células epiteliais, de fazer o estágio final de maturação dos linfócitos T, para que, posteriormente, passem à corrente circulatória.<sup>1,2</sup> Os linfócitos constituem de 80 a 85% das células do córtex e cerca de 15% das células da medula. Os linfócitos do córtex apresentam-se como blastos grandes e com intensa basofilia de citoplasma, devida à atividade proliferativa.<sup>1,2</sup> Após entrar no córtex do timo, a célula-tronco passa por quatro estágios para se tornar uma célula T diferenciada. A **Figura 8.24** mostra os quatro estágios pelos quais a célula T passa para se tornar uma célula madura e funcional.



**FIGURA 8.24** Estágios de maturação da célula T.

As células-tronco recém-chegadas ao timo têm como característica a expressão do CD44 e receptores para CD117 e IL-7.<sup>15</sup> O CD44 está envolvido com a migração leucocitária ao timo;<sup>8</sup> o CD117 é o receptor para o fator *stem cell* (SCFR) e



para o *c-kit* e está envolvido com a proliferação e diferenciação celular;<sup>8</sup> a IL-7 favorece a proliferação das células precursoras dos linfócitos recém-chegadas ao timo.<sup>8</sup> Após um dia da entrada das células ao timo, elas estão no primeiro estágio, no qual são chamadas de pró-células T, estágio caracterizado pela expressão do CD25, que é o receptor para a IL-2, um fator de crescimento para as células T.<sup>15</sup> A expressão do CD25 dá-se pelas citocinas (IL-1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) secretadas pelas células do córtex do timo.<sup>15</sup> Os pró-timócitos ou pró-células T proliferam rapidamente, mas ainda não expressam os receptores de células T (TCR $\beta$  e TCR $\alpha$ ). Nessa fase, a expressão dos receptores de células T são antígeno independente.<sup>15</sup> No segundo estágio, ocorre a diminuição da expressão do CD44 e CD117, o nível de expressão do CD25 continua alto, inicia a expressão do Thy-1, HSA e Sca-1/2, e 60% dos timócitos apresentam o fenótipo CD3-, CD4- e CD8-.<sup>15</sup> Nesse estágio, há o início dos rearranjos para a expressão do TCR $\beta$ , que inicia antes do TCR $\gamma$ , e a expressão de uma proteína transmembrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas (Ig) chamada de pré-T $\alpha$ .<sup>15</sup> A expressão do TCR $\beta$  junto com a pré-T $\alpha$ , na membrana citoplasmática do linfócito T, forma um heterodímero ligado por pontes dissulfeto chamado de pré-TCR.<sup>15</sup> A função do pré-TCR é selecionar células T TCR $\beta$ + com a finalidade de promover a proliferação e diferenciação dessas células, permitindo que haja o rearranjo do TCR $\alpha$  com posterior ligação de uma cadeia TCR $\beta$  com uma cadeia TCR $\alpha$ .<sup>15</sup> No estágio de pré-célula T tardia, não ocorre mais expressão do CD25 e do pré-T $\alpha$ , forma-se um receptor de célula T maduro chamado de complexo TCR $\beta\alpha$ . Essa célula, morfológicamente, caracteriza-se por ser um linfócito maduro CD4+ e CD8+.<sup>15</sup> O último estágio é caracterizado pelas células adquirirem um fenótipo único: elas serão linfócitos T CD4+ ou linfócitos T CD8+. Os linfócitos T CD4+ unem-se à região constante do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) classe II, e os CD8+ unem-se à região constante do MHC classe I. Os linfócitos CD4+ e CD8+ são dependentes do MHC (o antígeno deve estar ligado ao MHC) para exercer sua função. A **Figura 8.24** mostra a diferenciação funcional dos linfócitos T.

A função efetora é responsável pela imunidade celular, incluindo a defesa contra bactérias e fungos, citólise de células infectadas por vírus,

rejeição de transplantes e imunidade contra tumores. A função regulatória induz ou suprime a proliferação e diferenciação das células efectoras T e das células B. Os linfócitos T *helper* ou células indutoras CD4+ ativam outras células T (pela produção de IL-2, estimula as células T CD8+ a se tornarem citotóxicas) e promovem a produção de anticorpos pelas células B. Os linfócitos T citotóxicos CD8+ destroem uma célula específica pelo contato célula a célula. Os linfócitos *natural killer* (NK) fazem a mediação da resposta imune inata;<sup>15</sup> as células NK desenvolvem-se na medula óssea, são dependentes da ação da IL-15 e<sup>15</sup> são caracterizadas pela presença de CD2, CD11b, CD16 e CD56. Fazem o reconhecimento e a lise de células tumorais e células infectadas por vírus sem necessidade de reconhecer o MHC, regulam o sistema imune e a hematopoiese e fazem a resistência natural a transplantes alogênicos. As células NK reconhecem os seus alvos naturalmente, e esses alvos incluem células malignas, células infectadas por vírus, células fetais, células tímicas, células da medula óssea e macrófagos. Por esse motivo, representam a resposta imune inata, enquanto os linfócitos CD4+ e os CD8+ representam a resposta imune adaptativa. As células NK representam 15% dos linfócitos periféricos e também são encontradas no fígado, na cavidade peritoneal e na placenta.<sup>15</sup> As células K têm como finalidade mediar a citólise via anticorpo, são ativas contra infecções virais, tumores e doenças autoimunes. O **Quadro 8.3** mostra os principais marcadores dos linfócitos T e suas características.

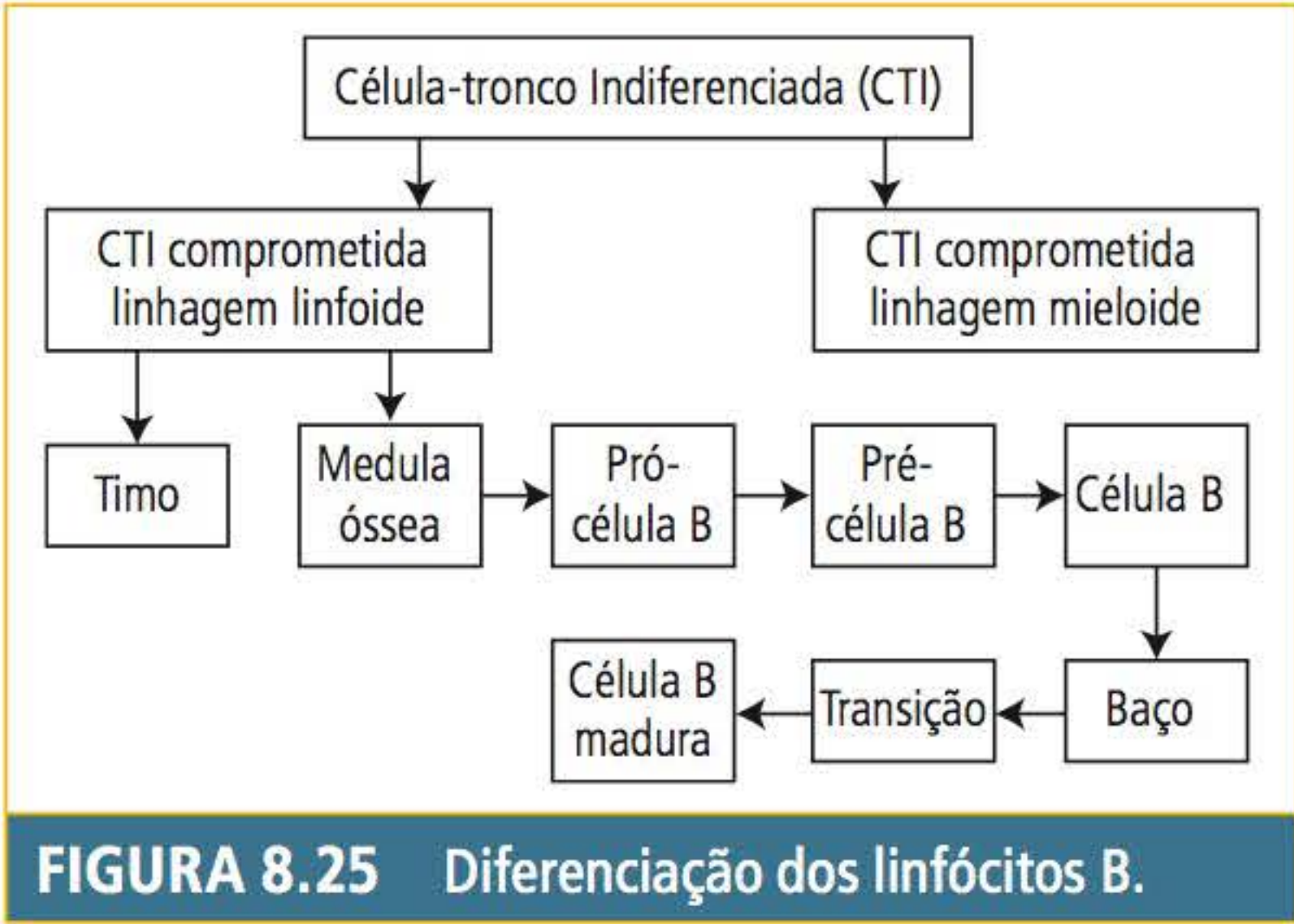
Os linfócitos T, além dos marcadores de membrana, apresentam marcadores enzimáticos. São enzimas que estão presentes na membrana citoplasmática, no citoplasma ou no núcleo e são identificadas por coloração citoquímica.<sup>1,2</sup> Entre elas, estão a  $\alpha$ -naftilesterase (encontrada no complexo de Golgi), a adenosinadeaminase (ADA) e a purina nucleosídeo fosforilase (PNP). Linfócitos T maduros possuem uma alta concentração de ADA e baixa de PNP e, à medida que o linfócito T se diferencia (maturação), esse padrão enzimático inverte-se. A terminal deoxinucleotidiltransferase (TdT) é uma DNA polimerase encontrada no núcleo e no citoplasma, tem uma aplicação grande na caracterização de leucemias linfocíticas agudas, que, em 50% dos casos, são TdT+, enquanto nas leucemias mieloides agudas, as células leucêmicas são TdT-.<sup>1,2</sup>



QUADRO 8.3 Principais marcadores dos linfócitos T e suas características	
MARCADORES	CARACTERÍSTICAS
CD 1	É composto por um grupo de cinco proteínas denominadas CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e. O CD1a expressa-se em linfócitos T do córtex do timo e em células dendríticas. O CD1c expressa-se em timócitos (linfócitos T do timo) e linfócitos B. Está correlacionado com a apresentação de antígenos
CD 2	É uma glicoproteína que se expressa no início da diferenciação da célula T e está presente em todos os linfócitos T maduros. Tem a função de adesão e ativação celular. O receptor para o CD2 é o CD58, antígeno encontrado nas células hematopoiéticas e em células de outros tecidos
CD 3	Presente em timócitos e linfócitos T maduros. Associado com receptores de células T fazendo uma interação com as tirosinoquinases (PTK) no sinal de transdução
CD 4	É uma glicoproteína que age como molécula de adesão aumentando a afinidade pelos receptores de célula T. Reforça a interação do linfócito T com outras células. É o receptor para o HIV
CD 5	Expressa-se em timócitos, linfócitos T maduros e em subpopulações de linfócitos B. Está relacionado com a resposta imune associada aos macrófagos. Faz a proliferação e ativação de linfócitos T e secreção da interleucina-2
CD 7	É um dos primeiros marcadores de linfócitos T, presentes em precursores de célula T tanto no fígado como na medula óssea, em timócitos e linfócitos T do sangue periférico. Está associado com a tirosinoquinase e envolvido no sinal de transdução de linfócitos T. Regula a atividade de adesão do linfócito T por regular a atividade das integrinas
CD 8	Presente nos timócitos, linfócitos T citotóxicos e subpopulações de células NK (do inglês <i>natural killer</i> ). Liga-se especificamente às moléculas da classe I do MHC (complexo principal de histocompatibilidade). Atua como um correceptor dos receptores de célula T, aumentando a ativação do linfócito T
CD 25	É uma glicoproteína presente em linfócitos T e B ativados e em monócitos. Células NK expressam CD25 após estarem ativadas pela IL-2. Presente nas células da tricoleucemia ( <i>hairy cell</i> )
CD 27	Presente em linfócitos T CD4+ e CD8+. Expressa-se em linfócitos B ativados e em plasmócitos. Está relacionado com a ativação e diferenciação dos linfócitos T
CD 28	Pertence à superfamília das imunoglobulinas, expressa-se em 95% das células CD4+ e 50% das CD 8+. Estimula a proliferação de linfócitos T na presença de mitógenos, de CD2 ou de anticorpos antirreceptores de células T. O seu receptor é o CD80, molécula expressa em linfócitos B ativados e em células apresentadoras de antígenos
CD 40 L	É membro da família dos receptores dos fatores de necrose tumoral (TNF-R). Está presente nas células ativadas, CD4+. Liga-se ao CD40, estimula a proliferação de linfócitos B, promovendo a síntese de imunoglobulinas. Atualmente, está numerado como CD154

**⇨ DIFERENCIAÇÃO DOS LINFÓCITOS B NA MEDULA ÓSSEA**

Os linfócitos B foram assim chamados porque, na década de 50, descobriu-se que a retirada da bursa de Fabricius, nas aves, comprometia a produção de anticorpos.<sup>15</sup> Os linfócitos B são derivados da célula-tronco comprometida com a linhagem linfóide que apresenta os seguintes marcadores: CD34+, CD38+ e CD10+. Essa célula pode tanto dar origem a linfócitos B quanto T; se ela migrar para o timo, dará origem aos linfócitos T e, se permanecer na medula óssea, dará origem aos linfócitos B. A diferenciação dos linfócitos B na medula passa pelos estágios de pró-célula B, pré-célula B e célula B. A célula B sai da medula e migra para os órgãos linfóides secundários, onde passa por uma fase de transição e torna-se uma célula B madura. A **Figura 8.25** mostra a diferenciação dos linfócitos B.

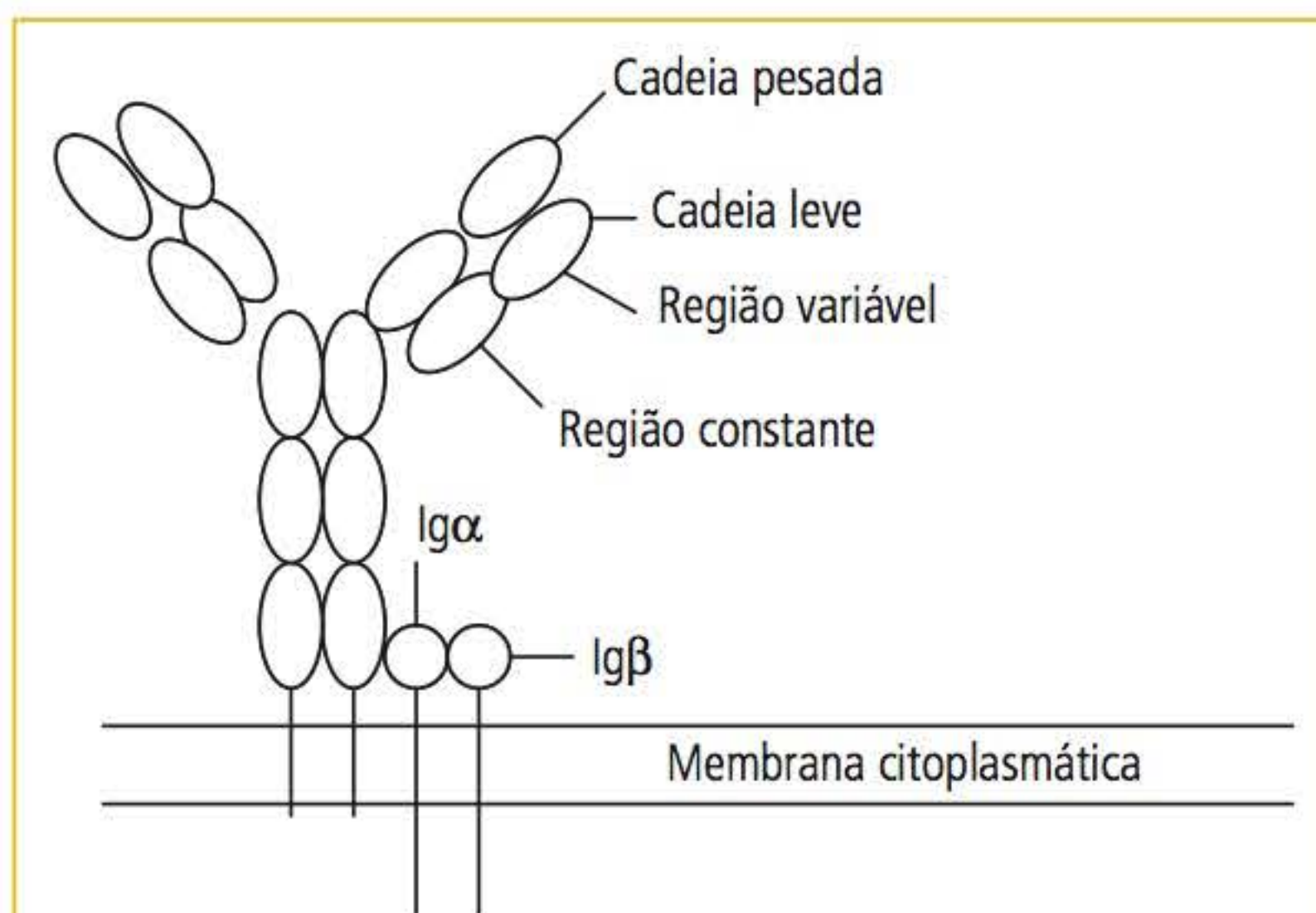


**FIGURA 8.25** Diferenciação dos linfócitos B.

A pró-célula B é o estágio mais imaturo na diferenciação do linfócito B e é reconhecida por expressar os seguintes marcadores: CD10+, CD34+ e CD19+, sendo que o CD19 é considerado um marcador específico de célula B.<sup>15</sup> Nesse estágio, ocorre o início do rearranjo gênico para a formação da cadeia pesada das imunoglobulinas (Ig).<sup>15</sup>



Quando o CD34 não é mais expresso, e, no citoplasma, é detectada a proteína da cadeia pesada das Ig ( $\mu$ ), a célula está no estágio pré-célula B.<sup>15</sup> Quando ocorre rearranjo e expressão da cadeia leve e expressão na membrana plasmática de IgM, a célula está no estágio de célula B.<sup>15</sup> O linfócito B apresenta na membrana citoplasmática os receptores de células B (BCR), que são moléculas de imunoglobulinas formadas por duas cadeias pesadas (H, *heavy*) associadas a duas cadeias leves (L, *light*) e, junto à molécula do receptor e expressas na membrana citoplasmática, estão duas cadeias de imunoglobulinas chamadas de Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ . A **Figura 8.26** mostra uma representação esquemática da estrutura do receptor de célula B.



**FIGURA 8.26** Representação esquemática da estrutura do receptor de célula B.

O gene que codifica a cadeia pesada das imunoglobulinas está localizado no cromossomo 14;<sup>15</sup> fazendo-se a leitura da posição 5' do gene para a posição 3'. A primeira região codificante é a variável (V, 7 regiões), seguida da região diversa (D, 30 regiões), posteriormente a região de junção (J, com 6 regiões) e, por fim, a região constante (C, com dez regiões). Depois, ocorre um rearranjo gênico, e a leitura do gene muda, ficando 5' $V_H D_{H1} J_{H2-6} C_{1-10}$  3'. A partir do rearranjo gênico, ocorre a transcrição com formação do RNAm que, após o processamento pós-transcricional, fica 5' $V_H D_H J_{H1}$  3'.

A cadeia leve das imunoglobulinas pode ser de dois tipos: kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ); a cadeia  $\kappa$  é sintetizada a partir do cromossomo 2, e a  $\lambda$ , do cromossomo 22 e estão ligadas de modo covalente à cadeia pesada.<sup>15</sup> Fazendo-se a leitura do gene da cadeia  $\kappa$  da posição 5' para a posição 3', a primeira região codificante é a variável (V, com sete regiões), a segunda é a região de junção (J, com 5 regiões) e,

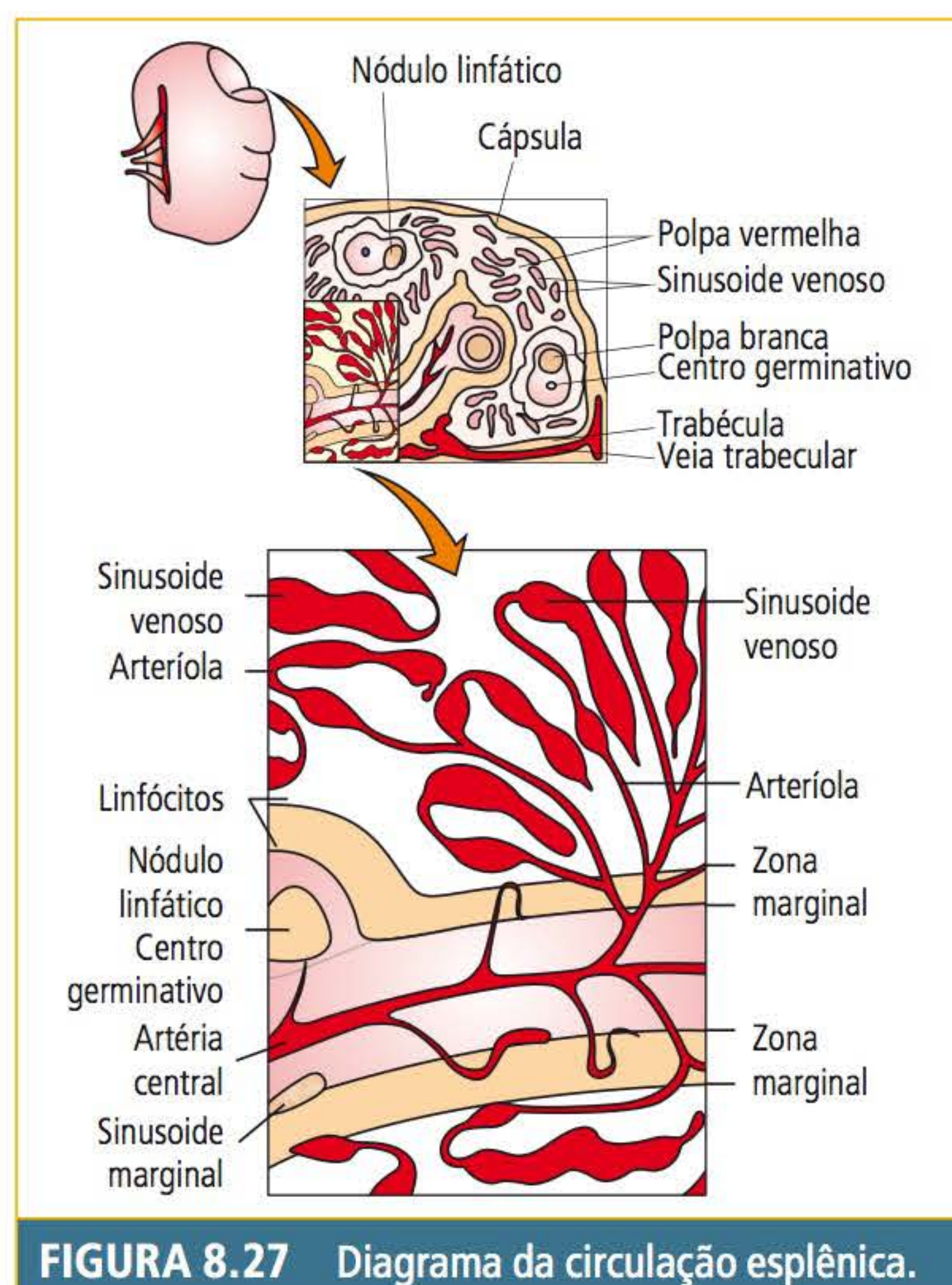
por último, uma região constante; após rearranjo gênico, a leitura do gene fica 5' $V_k J_k C_1$ . A partir dessa conformação, ocorre a transcrição e a formação da cadeia proteica. Fazendo a leitura do gene da cadeia  $\lambda$  da posição 5' para 3', a primeira região codificante é a região variável (V, com 10 regiões), posteriormente há uma associação das regiões J e C, formando sete regiões ( $J\lambda_1-C\lambda_1$ ,  $J\lambda_2-C\lambda_2$  até  $J\lambda_7 C\lambda_7$ ), após rearranjo gênico, o RNAm transcreve  $V\lambda J\lambda C\lambda$ , que vai formar a cadeia proteica  $\lambda$ . A variedade de anticorpos que pode ser formada é muito grande, e essa variabilidade pode ser explicada pela união entre as diferentes regiões gênicas (V, J, D e C); a segunda explicação é que, no núcleo das células B, há uma enzima chamada de TdT (terminal deoxinucleotidil transferase), que pode inserir nucleotídeos nas regiões D- $J_H$  e  $V_H D_{J_H}$ , aumentando a variação na formação de anticorpos. O linfócito torna-se ativado quando o antígeno ou outra célula interage com o BCR. A associação com a Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  é importante porque a cauda intracelular do BCR é muito curta e da Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  é longa, e essa última é responsável pelo início da cascata de sinalização intracelular.<sup>15</sup> A cascata intracelular aumenta a proliferação, a sobrevivência, a diferenciação e a produção de anticorpo específico pelo linfócito B. O nível de ativação do BCR e a consequente transcrição podem ser modificados por correceptores expressos na membrana citoplasmática do linfócito B, que podem ligar-se a frações do complemento, células do estroma, linfócito T ativado e outras células presentes nos órgãos linfoides secundários.<sup>15</sup>

O desenvolvimento das células B é feito pela interação célula a célula com as células do estroma da medula óssea via integrina (VLA-4) expressa no linfócito B, com moléculas de adesão (VCAM-1) expressas na membrana citoplasmática das células do estroma da medula óssea. A VLA-4 também se liga à fibronectina.<sup>15</sup> As células do estroma da medula óssea secretam citocinas, entre elas a IL-7, que também é chamada de linfopoietina, específica para regular a proliferação e diferenciação do linfócito B.<sup>15</sup> Quando o linfócito B está diferenciado, ele migra para os órgãos linfoides secundários, entre eles, o baço.

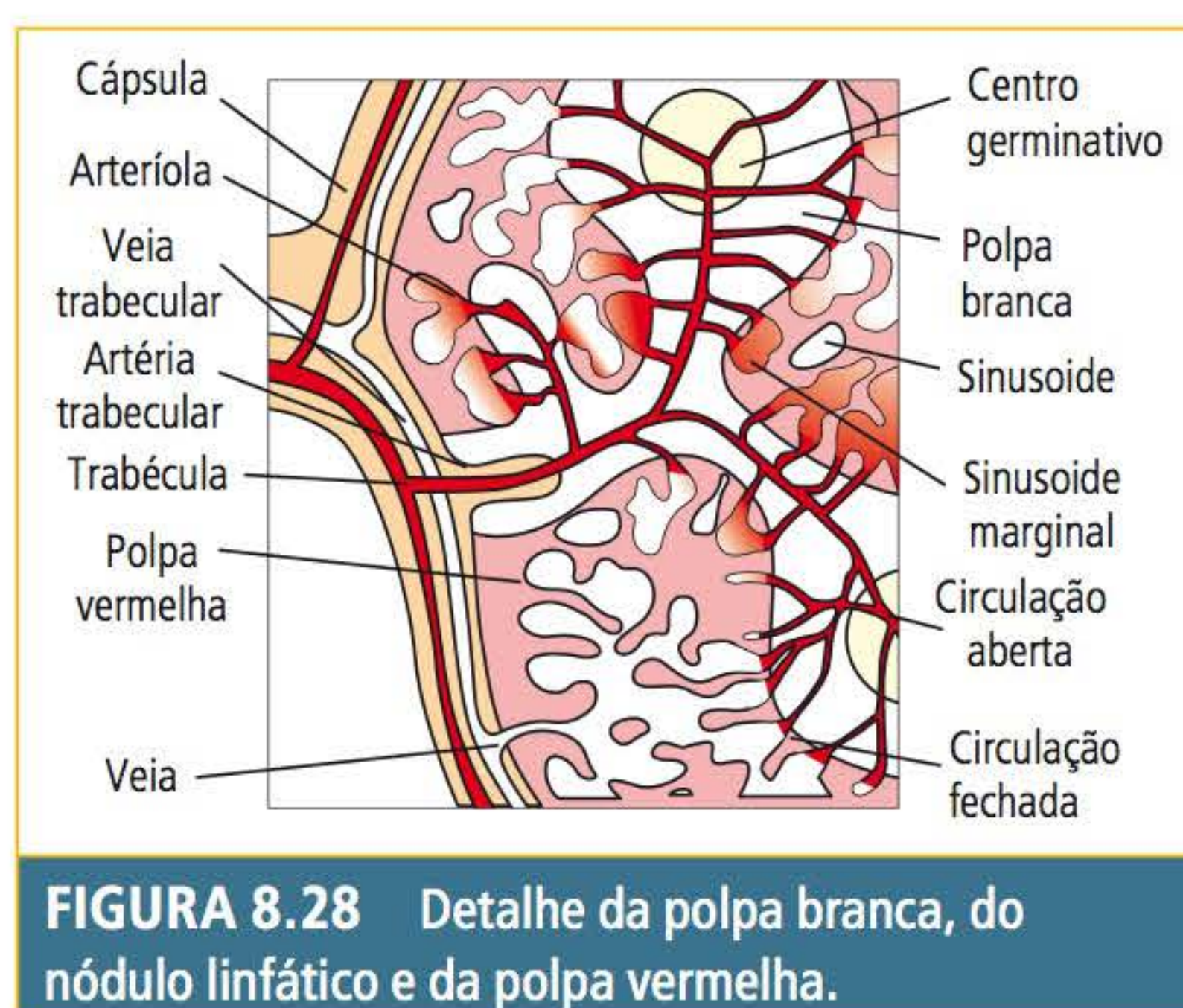
O baço é o maior acúmulo de tecido linfóide do organismo e é o único órgão linfóide interposto à circulação sanguínea. É revestido por



uma cápsula de tecido conetivo, cuja parte interna dá origem a uma extensa rede de trabéculas que o divide em compartimentos, conferindo-lhe um aspecto de esponja. Entre esses compartimentos, fica o parênquima ou a polpa tissular. O parênquima é dividido em polpa branca (assim chamada por ter um predomínio de linfócitos) e em polpa vermelha, que tem predomínio de eritrócitos.<sup>1,2</sup> A artéria trabecular penetra o baço em direção à polpa branca e vai até o nódulo linfático. Ao longo desse trajeto, dá origem a ramos colaterais (arteríolas), que penetram na polpa vermelha.<sup>1,2</sup> Alguns ramos dessas arteríolas formam, próximo à sua terminação, um espessamento chamado de sinusoide, constituído de macrófagos, células epiteliais e linfócitos.<sup>1,2</sup> As arteríolas levam o sangue para os sinusoides, o qual passa para as veias da polpa vermelha, e essas se anastomosam formando as veias trabeculares que saem do baço. Toda a massa sanguínea circulante passa pelo baço e é filtrada nos sinusoides, onde qualquer antígeno estranho é fagocitado.<sup>1,2</sup> A **Figura 8.27** mostra um diagrama da circulação esplênica, e a **Figura 8.28**, o detalhe da polpa branca, do nódulo linfático e da polpa vermelha.



**FIGURA 8.27** Diagrama da circulação esplênica.



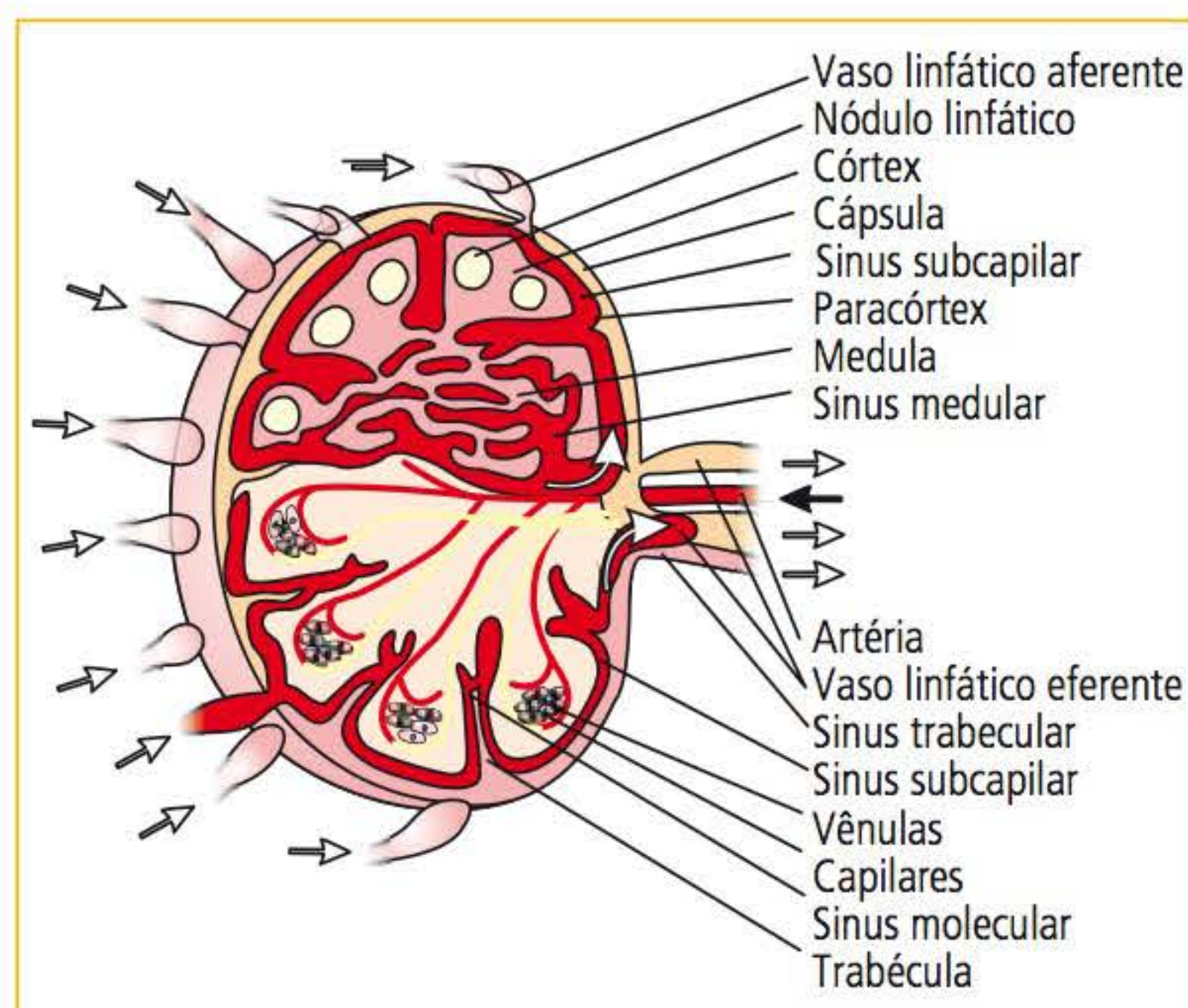
**FIGURA 8.28** Detalhe da polpa branca, do nódulo linfático e da polpa vermelha.

Nos nódulos linfáticos, localizado na polpa branca, está o centro germinativo.<sup>1,2</sup> Quando o linfócito B chega ao baço, ele localiza-se junto à artéria trabecular (polpa branca) e é chamado de célula B em transição ( $T_1B$ ), que dá origem à célula  $T_2B$ , que, por sua vez, dá origem ao linfócito B maduro.<sup>15</sup> O linfócito B maduro recircula e migra aos linfonodos, às placas de Peyer e a outros tecidos linfoides do organismo.<sup>15</sup> As células  $T_2B$  e os linfócitos maduros formam o folículo primário, que está associado ao linfócito T e às células  $T_1B$  e localizado junto à artéria trabecular. O centro germinativo junto com a zona do manto forma o folículo secundário, onde as células B se fazem presentes.<sup>15</sup> No folículo secundário, também se localizam os macrófagos e as células dendríticas (células apresentadoras de antígenos, CAP). Os linfócitos B, além de serem estimulados por macrófagos e células dendríticas, também o são por linfócitos T e por polissacarídeos bacterianos.<sup>15</sup> A ativação de linfócitos B por polissacarídeos bacterianos caracteriza uma resposta inata aos patógenos bacterianos porque a opsonização desses patógenos permite a fagocitose pelo neutrófilo.<sup>15</sup> Quando o linfócito B, localizado no folículo primário, é ativado pelos linfócitos T, antígenos dependentes voltam à forma blástica, maturam a plasmócitos e secretam IgM (resposta inicial ao processo infeccioso). Os linfócitos B do centro germinativo, quando expostos a antígenos solúveis expressos pela célula dendrítica, voltam à forma de blasto e maturam a plasmócitos, secretando imunoglobulina de alta afinidade; parte dessas células tornam-se linfócitos de memória.<sup>15</sup>

Os linfonodos ou gânglios linfáticos são estruturas ovóides semelhantes a um rim, que



apresentam um lado com uma reentrância, chamada de hilo, rodeado por uma cápsula fibrosa, que penetra o linfonodo e forma uma rede (malha – trabéculas) fibrosa.<sup>1,2</sup> Através do hilo, vasos sanguíneos entram e saem do linfonodo, as artérias originam as arteríolas, que se espalham no córtex ao longo das trabéculas e formam uma rede de capilares que se transformam em vênulas, passando do córtex para a medula, e saem do linfonodo como veias.<sup>1,2</sup> Pela passagem por entre as células endoteliais (diapedese) das vênulas, os linfócitos ganham a circulação linfática.<sup>1,2</sup> A linfa penetra o linfonodo pelos vasos linfáticos aferentes, percorre o córtex e a medula e sai pelo vaso linfático eferente.<sup>1,2</sup> Nesse trajeto, percorrido lentamente, a linfa fica em contato com os macrófagos, que fazem sua filtração fagocitando partículas estranhas. A **Figura 8.29** mostra uma representação esquemática de um linfonodo.



**FIGURA 8.29** Representação esquemática de um linfonodo.

A célula que predomina no linfonodo é o linfócito. No córtex, os linfócitos estão dispostos em grupos, chamados de folículos ou nódulos linfóides. A área central do folículo é chamada de centro germinativo, que é o principal ponto de estímulo antigênico.<sup>1,2</sup> Nas áreas entre os folículos, os linfócitos estão distribuídos difusamente e, na região que separa o córtex da medula (paracórtex), os linfócitos estão dispostos em agrupamentos. Os folículos são ocupados por linfócitos B e representam o sítio de resposta humoral (produção de anticorpos). Dois tipos de células linfóides estão presentes no centro germinativo: os centroblastos (linfócitos B grandes e ativados) e os centrócitos

(linfócitos B pequenos derivados dos centroblastos).<sup>1,2</sup> O centro germinativo também contém linfócitos T, que são CD4+, CD5+ e CD57+ e pertencem ao subtipo TH<sub>2</sub> (células T *helper*); essas células são importantes para o início da interação entre as células T e B e na ativação das células B (produção de anticorpos). Os centroblastos maturam a plasmócitos e secretam imunoglobulinas de alta afinidade. Alguns centrócitos também maturam a plasmócitos e parte deles torna-se células de memória.<sup>1,2</sup> A função dos linfócitos está baseada na sua interação com outras células, entre elas os macrófagos e as células dendríticas. Os macrófagos são encontrados em grande número nos linfonodos que, além de removerem substâncias estranhas (entre elas patógenos), também processam esses antígenos para apresentá-los aos linfócitos T.<sup>1,2</sup> A célula dendrítica também é uma célula apresentadora de antígeno e igualmente os apresenta aos linfócitos T.<sup>1,2</sup> Os macrófagos e as células dendríticas interagem com os linfócitos B com a finalidade de manter a produção de anticorpos e a geração de células de memória.<sup>1,2</sup> O **Quadro 8.4** traz os principais marcadores dos linfócitos B e suas características.

Para produzir anticorpos, o linfócito B maduro passa para a forma de plasmócito. Entre a forma de linfócito B maduro e a de plasmócito, há um estágio intermediário de maturação cujas células são caracterizadas morfológicamente como linfócitos atípicos (linfócitos reativos, virócitos ou *Turk cells*).<sup>1,2</sup> Os linfócitos atípicos podem ser encontrados no sangue periférico de pacientes com doenças imunológicas em que haja produção de anticorpos, como mononucleose infecciosa e outras doenças virais. Os linfócitos atípicos foram descritos por Turk (*Turk cell*), em 1907, em um paciente como mononucleose infecciosa.<sup>1,2</sup> Em 1923, Downey descreveu três morfologias para os linfócitos atípicos:<sup>1,2</sup> linfócito atípico dos tipos I, II e III. O linfócito atípico tipo I, morfológicamente, é descrito como uma célula grande, núcleo convoluto, citoplasma abundante com basofilia variável, podendo apresentar vacúolos e grânulos; por apresentar morfologia semelhante ao monócito, recebe a denominação de monocitoide.<sup>1,2</sup> O linfócito atípico do tipo II morfológicamente se caracteriza por ter citoplasma escasso com basofilia difusa e geralmente intensa, e o núcleo pode apresentar nucléolos; é uma morfologia do tipo plasmocitoide ou linfoblastoide. O linfócito atípico do tipo III



QUADRO 8.4 Principais marcadores dos linfócitos B e suas características	
MARCADORES	CARACTERÍSTICAS
Imunoglobulina citoplasmática	Os linfócitos B expressam imunoglobulina no citoplasma durante sua maturação e diferenciação. No linfócito B maduro, estão expressas na membrana citoplasmática (secreção).Esse marcador, além de caracterizar o linfócito B, pode correlacioná-lo com o estágio de maturação
CD5	São encontrados em uma pequena porcentagem de linfócitos B e em linfócitos T. Linfócitos B CD5+ são encontrados na vida fetal e em 90-95% dos casos de leucemia linfocítica crônica de célula B
CD10	Glicoproteína. Expressa-se nos estágios iniciais da diferenciação do linfócito B e regula sua maturação
CD19	Fosfoproteína. Expressa-se durante todo o estágio de diferenciação do linfócito B, não está presente no plasmócito. Está correlacionado com a ativação celular, porque fosforila resíduos de tirosina, por meio da ativação das tirosinoquinases. Induz a liberação de cálcio intracelular, ativando a fosforilase C e levando a produção de DAG e inositol 1,4,5 trifosfato
CD20	Expressa-se em 30% dos precursores de células B e é detectado em um terço das leucemias linfocíticas agudas de células B
CD11	Glicoproteína. Regula a ativação do linfócito B, expressa-se em linfócitos maduros e é um receptor para o complemento (CR2). É, também, receptor para o vírus Epstein-Barr, unindo-se à proteína GP350 do vírus
CD22	Fosfoglicoproteína. Presente nos estágios pró-célula B e pré-célula B, durante a diferenciação normal do linfócito B
CD23	Função de célula apresentadora de antígeno ao linfócito T quando está complexado a anticorpos de tipo IgE. Quando expresso juntamente com CD5, constitui diagnóstico de leucemia linfocítica crônica e caracteriza, também, linfócitos B de sangue de cordão
CD24	Sialoglicoproteína. Presente nos linfócitos B durante todos os estágios de maturação
CD40	Fosfoproteína. Expressa-se durante todo o estágio de maturação, à exceção dos plasmócitos. Presente tanto nas leucemias agudas como nas crônicas de célula B
CD72	Presente em todos os estágios de maturação das células B, exceto nos plasmócitos
CD79	Compostos de duas proteínas: CD79a e CD79b. Importantes na expressão de IgM de superfície e estão relacionadas com o sinal de transdução
CD80 e CD824,26	Além de expressos em linfócitos B, expressam-se em linfócitos T

caracteriza-se por ter morfologia ameboide por-  
que emite projeções citoplasmáticas irregulares. O  
citoplasma apresenta-se basófilo, principalmente  
junto à membrana citoplasmática.<sup>1,2</sup> A **Figura  
8.30** mostra fotografias dos linfócitos atípicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.

Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do leu-  
cograma. São Paulo: Robe; 2003.

2.

Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. Hematologia laborato-  
rial. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.

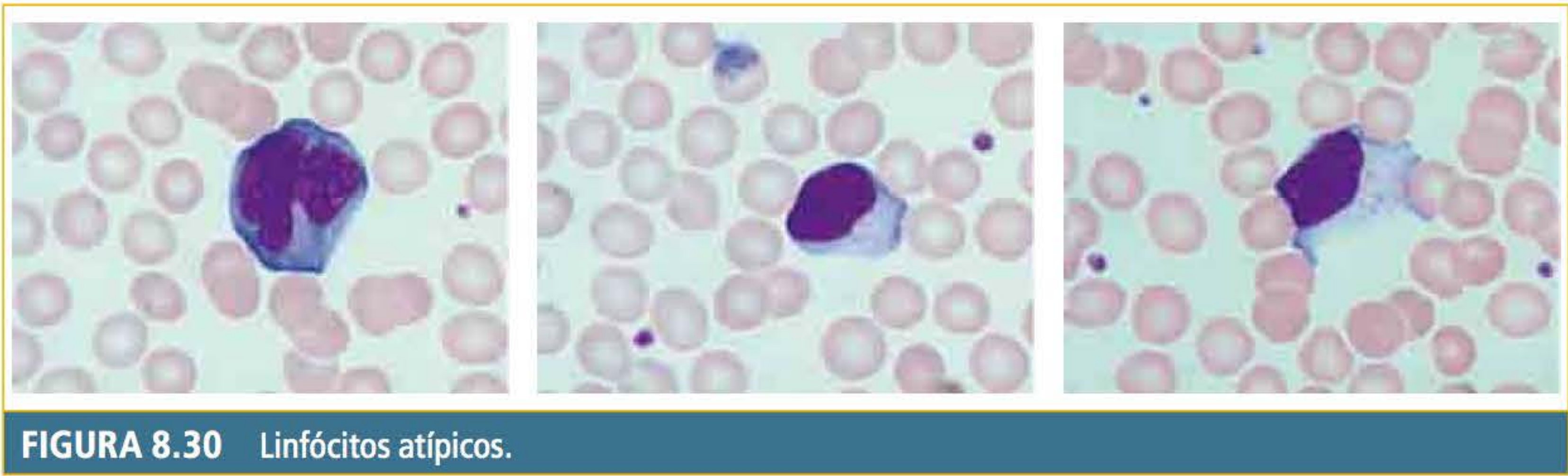


FIGURA 8.30 Linfócitos atípicos.



3. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
4. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 5. ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.
5. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
6. Gobber LM, Eckman JA, Sterba PM, Vasagar K, Schroeder JT, Golden DBK, et al. Expression of activation markers on basophils in a controlled model of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(5):1181-8.
7. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cell and their niche. *Trends Immunol.* 2005;26(8):426-33.
8. Lichtmann MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
9. Kraft DL, Czechowicz A, Bhattacharya D, Weissman IL. Ability of anti c-kit targeting monoclonal antibody ACK-2 to target hematopoietic stem cell and facilitate engraftment of human CD34+ engraftment and hematolymphoid development in immunodeficient mice. *Biol Blood Marrow Tr.* 2007;13(2):72.
10. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
11. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, et al. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
12. Miale JB. Laboratory medicine: hematology. 6th ed. St. Louis: Mosby; 1982.
13. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
14. Quindry JC, Stone WL, King J, Broeder CE. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(7):1139-45.
15. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. Hematology basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
16. Simon D, Simon H. Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(6):1291-300.
17. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 125(2):S73-80.
18. Cavaillon JM. The role of cytokines in allergic processes. *Immuno-anal Biol Spec.* 1994;9:15-22.
19. Vilela ALM. Sistema linfático [Internet]. [S. l.]: AFH; [20--?] [capturado em 20 abr 2015]. Disponível em: [www.afh.bio.br/imune/linfa1.asp](http://www.afh.bio.br/imune/linfa1.asp).

### Leituras Recomendadas

- Ardor MJ, Westgard JC, Dutcher TF. Band neutrophils counts are unnecessary for the diagnosis of Infection in Patients with normal total leucocyte counts. *Am J Clin Pathol.* 1994;102(5):646-9.
- Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser S, Longo DL, Jameson JL. Harrison's: principles of Internal Medicine. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Clarke G. Toward abandoning the band: a practice recommendation of the CCQLM. *CCQML.* 2006;5(1):1-5.
- Contran RS, Kumar V, Robbins LS. Robbins: pathologic basis of disease. Philadelphia: W. B. Saunders; 1994.
- Edling CE, Hallberg B. c-Kit-a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):1995-8.
- ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. *J Clin Pathol.* 1993;46(3):198-203.
- National Committee for Clinical Laboratories Standards. Methods for the erythrocyte sedimentation rate (ESR) test. 3rd ed. Villanova: NCCSL; 1993.
- Santos VM, Cunha SFC, Cunha DF. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidades e limitações. *Rev Associação Med Bras.* 2000;48(3):232-6.
- Silva PH, Hashimoto Y. Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária. Rio de Janeiro: Revinter; 2006.
- Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology principles, procedures, correlations. 2nd ed. New York: Lippincott; 1998.
- Lewis SM, Kumari S. Erythrocyte sedimentation rate (ESR). In: Lewis SM, Kumari S. Standard operating procedures for haematology. New Delhi: WHO; 2000.



**Esta página foi deixada em branco intencionalmente**



## SÉRIE BRANCA – LEUCOGRAMA

### PROCESSOS INFECCIOSOS BACTERIANOS, INFLAMATÓRIOS E INFECÇÃO POR PROTOZOÁRIOS

9



#### FISIOPATOLOGIA DO PROCESSO INFECCIOSO BACTERIANO AGUDO

Os sistemas de defesa do organismo humano são representados pela imunidade inata e pela imunidade adaptativa. A imunidade inata é representada pelas barreiras físicas, sistema complemento e pelos fagócitos: macrófagos, granulócitos e células dendríticas. A imunidade adaptativa é representada pelos linfócitos T e B. As barreiras físicas são representadas pela pele, epitélio (respiratório, gastrintestinal) e mucosas (oral, auditiva e ocular), que, além de atuarem como uma barreira física, secretam substâncias que inibem a colonização pelo patógeno. A flora normal desses tecidos também representa uma barreira porque compete com o patógeno por nutrientes e pelos pontos de fixação.

Os patógenos humanos, ou um agente infeccioso, são definidos como todo o organismo capaz de causar infecção, como bactérias, vírus, riquetsias, fungos, helmintos e protozoários.<sup>1,2</sup> Esses patógenos podem ser extracelulares, são acessíveis às moléculas solúveis do sistema imune, ou intracelulares; para que eles sejam eliminados, a célula infectada deve ser destruída. O patógeno deve colonizar o tecido em número suficiente para suplantar as células e as moléculas da imunidade inata. Quando um patógeno transpassa as barreiras físicas, suplanta as células e as moléculas solúveis da imunidade inata, ele começa a colonizar um tecido ou órgão; nesse momento, instala-se o processo infeccioso. A infecção é definida como a penetração, alojamento e multiplicação do agente infeccioso no hospedeiro, determinando a ocorrência de reação a si próprio ou a seus produtos tóxicos, no local onde se encontram ou a distância.<sup>1,2</sup>

Na área correspondente à porta de entrada, onde o agente infeccioso se implanta e prolifera, os mecanismos locais de defesa do hospedeiro podem ser suficientes para que não haja nenhuma evidência clínica da infecção.<sup>1,2</sup> Quando esses mecanismos não são suficientes, ocorre a reação inflamatória, que condiciona, no sítio inflamatório, o aparecimento de calor, dor, hiperemia e edema.<sup>1,2</sup> Nessa situação, os mecanismos locais de defesa foram insuficientes para bloquear a proliferação e a penetração do agente infeccioso e dos seus produtos tóxicos, configurando, então, a doença infecciosa clinicamente reconhecida.<sup>1,2</sup> A inflamação destrói, dilui, causa lesão no agente infeccioso e também restaura o tecido lesado. É um processo de proteção ao organismo; sem ele, as infecções não seriam detectadas, os ferimentos cirúrgicos nunca se restaurariam e os órgãos lesados seriam fontes permanentes de secreção leucocitária e dor.<sup>1,2</sup> A inflamação é uma reação de defesa do organismo humano a uma agressão celular.<sup>1,2</sup> Os medicamentos anti-inflamatórios têm como objetivo controlar as sequelas indesejáveis do processo inflamatório.<sup>1,2</sup>

Quando se instala um processo infeccioso, o primeiro componente da imunidade inata a ser ativado é o sistema complemento, cujas proteínas circulam no sangue e na linfa e são ativadas, no início do processo infeccioso, pelo próprio



patógeno. Essa é a ativação do sistema complemento pela via alternativa; a via clássica só é ativada na presença de anticorpos. A via alternativa é ativada a partir da hidrólise espontânea da fração  $C_3$ ; essa hidrólise aumenta muito na presença do agente infeccioso e gera as frações  $C_{3a}$  e  $C_{3b}$ .  $C_{3b}$  ativa convertases de  $C_3$ , amplificando a formação de  $C_{3b}$ , que é uma opsonina que vai recobrir o patógeno permitindo que neutrófilos e macrófagos façam a fagocitose. Os macrófagos teciduais tornam-se ativados e secretam citocinas, como interleucinas 1, 6, 8 e 12, e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Nesse momento, inicia a resposta inflamatória celular com alterações no hemograma que devem ser interpretadas à luz da cinética dos neutrófilos e monócitos. A fração  $C_{3b}$  também forma as convertases de  $C_{5a}$ , que fazem a ativação de  $C_{5a}$ , e das frações de  $C_6$  a  $C_9$ , que fazem a lise do patógeno e recrutam fagócitos ao sítio inflamatório. Durante um processo infeccioso, a formação de anticorpos faz-se necessária porque alguns patógenos (*S. pyogenes* e *S. aureus*) não sofrem a ação do complemento devido à grande quantidade de ácido siálico na membrana citoplasmática dessas bactérias.

O processo inflamatório passa por várias fases: fase irritativa, vascular, exsudativa, degeneração e necrose e uma fase reparativa.<sup>1,2</sup>

A fase irritativa do processo inflamatório é caracterizada pela vasodilatação e pela hiperemia causadas por mediadores químicos, como os fatores da fase contato da cascata da coagulação sanguínea (cininogênio de alto peso molecular, pré-caliceína, fator XII e fator XI), o sistema fibrinolítico, o sistema complemento, os mediadores liberados pelas células teciduais após ação do patógeno e os mediadores de natureza lipídica gerados a partir de componentes de membrana.<sup>1,2</sup> Os cininogênios de baixo peso molecular apresentam uma ação vasodilatadora, são quimiotáticos fracos para macrófagos e induzem a dor.<sup>1,2</sup> Os fibrinopeptídeos gerados pelo sistema fibrinolítico e pela cascata da coagulação sanguínea têm ação quimiotática para os neutrófilos.<sup>1,2</sup>

Os mediadores liberados pelas células após a ação do agente inflamatório são a histamina, liberada pelos mastócitos e basófilos, que faz vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular e aumenta a resposta migratória dos neutrófilos e dos eosinófilos ao sítio inflamatório,<sup>1,2</sup> e a serotonina, que, liberada dos grânulos plaquetários, tem um

efeito vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular e favorecendo a exsudação plasmática.<sup>1,2</sup> As células lesadas liberam catabólitos com efeito sobre a circulação; células em hipoxia aumentam a liberação de nucleotídeos (adenosina difosfato [ADP]), que promovem a vasodilatação e aumentam o fluxo sanguíneo para a região atingida.<sup>1,2</sup> Após a morte celular, ocorre a liberação de peptídeos, que têm ação quimiotática para leucócitos.<sup>1,2</sup> As prostaglandinas produzem vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular.<sup>1,2</sup> As citocinas, substâncias de natureza proteica com amplo espectro de ação e liberadas por várias células, estão envolvidas na proliferação endotelial e fibroblástica por meio do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento para fibroblastos (FGF).<sup>1,2</sup> O PDGF é produzido por plaquetas, macrófagos e células endoteliais, o EGF tem efeito mitogênico sobre células endoteliais, e o FGF tem grande atividade mitogênica sobre células endoteliais (são fatores angiogênicos) e são sintetizados por macrófagos ativados e linfócitos T.<sup>1,2</sup> A interleucina-1 (IL-1) tem sua produção estimulada por produtos bacterianos, células mortas, vírus e interferon e é produzida por macrófagos, células dendríticas e fibroblastos. A IL-1 tem como efeito local a ativação do endotélio vascular e dos linfócitos NK e faz destruição tecidual. Como efeito sistêmico, causa febre e aumenta a produção de IL-6.<sup>1,2</sup> O TNF- $\alpha$  tem como efeito local ativação do endotélio vascular e aumento da permeabilidade vascular e promove a passagem de imunoglobulinas e frações do complemento para os tecidos. Como efeito sistêmico, causa febre, migração de leucócitos ao sítio inflamatório e choque séptico.<sup>1,2</sup> A IL-2 é um fator de crescimento para a célula T, é produzida por linfócitos T *helper* após sua união ao MHC II, induz a secreção de interferon- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, ativa macrófagos e aumenta a atividade de linfócitos NK.<sup>1,2</sup> A interleucina-4, produzida pelo linfócito T, ativa o linfócito B, atua na proliferação de células-tronco e na diferenciação de mastócitos e eosinófilos.<sup>1,2</sup> A interleucina-5, produzida pelo linfócito T, age com a IL-4 na ativação da célula B, favorece a expressão de IgA e IgE e atua na diferenciação de eosinófilos.<sup>1,2</sup> A interleucina-6, produzida pelo linfócito T, B, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, tem como efeito local ativação de linfócitos e aumento da produção de anticorpos. Como efeito sistêmico, causa

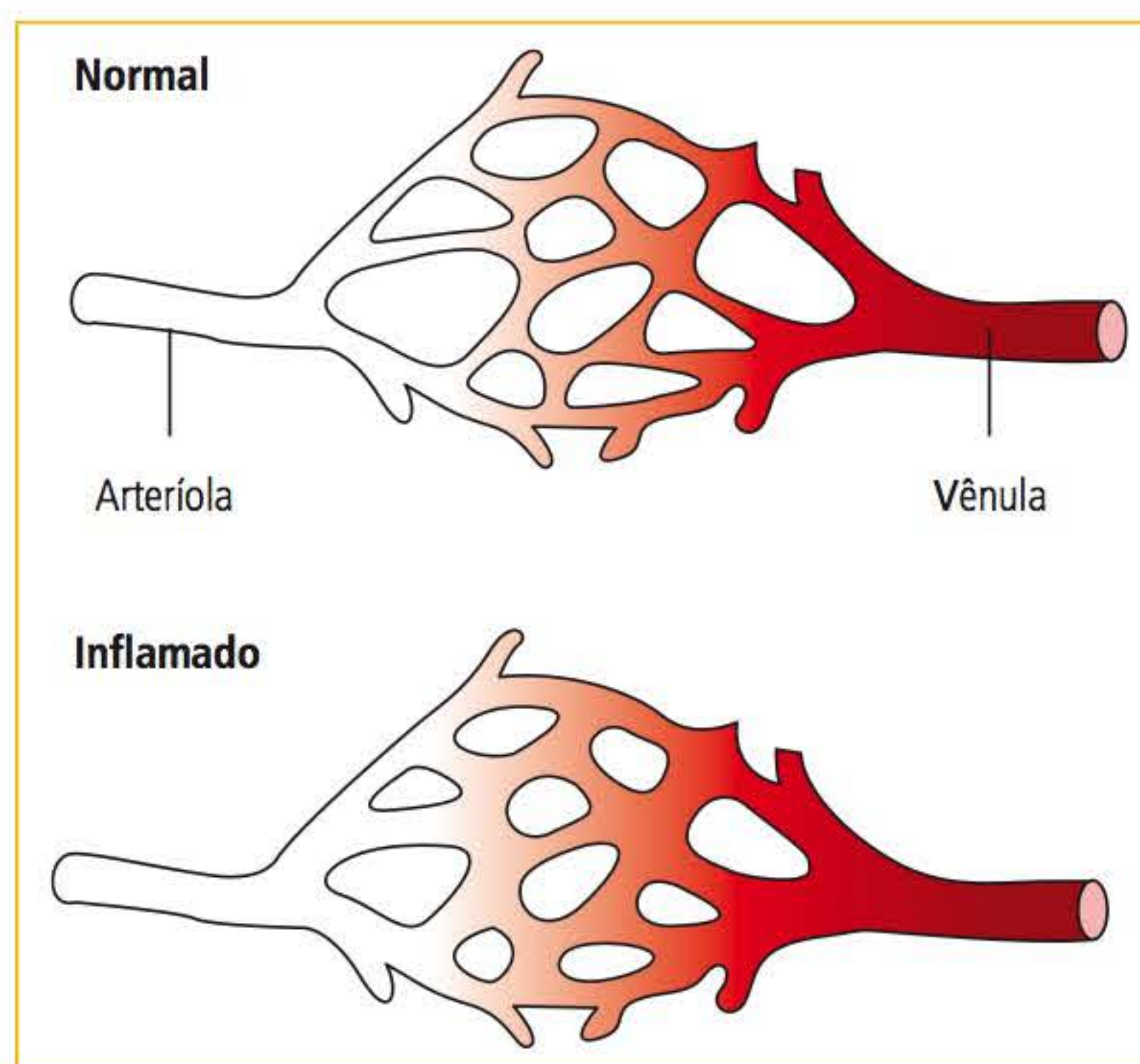


febre e induz a produção de proteínas de fase aguda (PCR e fibrinogênio).<sup>1,2</sup> Células endoteliais, fibroblastos, monócitos circulantes, hepatócitos e plaquetas produzem IL-8, fator quimiotático para neutrófilos, peptídeos ativadores de neutrófilos, proteína inflamatória de macrófago e proteína quimiotática para monócitos.<sup>1,2</sup> O interferon (IFN) pode ser do tipo I e II. O do tipo I é produzido por qualquer célula infectada por vírus e pode ser o IFN- $\alpha$  ou IFN- $\beta$ .<sup>1,2</sup> O IFN do tipo II é o interferon- $\gamma$ , produzido por linfócitos T e linfócitos T NK.<sup>1,2</sup> O interferon apresenta um efeito antiviral e antineoplásico, e o IFN- $\gamma$  é um modulador da resposta imunológica, interfere na síntese de anticorpos, aumenta a expressão do MHC II, ativa macrófagos e aumenta a atividade microbicida e tumoricida dos macrófagos.<sup>1,2</sup>

Os mediadores originados a partir de lipídeos de membrana são produzidos por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais e são as prostaglandinas (PG), os leucotrienos (LT) e o fator ativador de plaquetas (PAF, do inglês *platelet activating factor*).<sup>1,2</sup> As PG I<sub>2</sub> são produzidas pelo endotélio e têm ação antiagregante e vasodilatadora.<sup>1,2</sup> A PG E<sub>2</sub>, produzida em vários tecidos, tem ação vasodilatadora e controla a atividade de macrófagos e linfócitos, e a PG F<sub>2</sub> tem ação vasodilatadora e aumenta a permeabilidade vascular.<sup>1,2</sup> Os leucotrienos são quimiotáticos poderosos, aumentam a permeabilidade vascular e fazem a vasodilatação e a contração da musculatura lisa do intestino e dos brônquios.<sup>1,2</sup> O PAF produzido por plaquetas, neutrófilos, macrófagos, mastócitos e células endoteliais. Além de ativar as plaquetas, faz vasodilatação e também aumenta a permeabilidade vascular.<sup>1,2</sup>

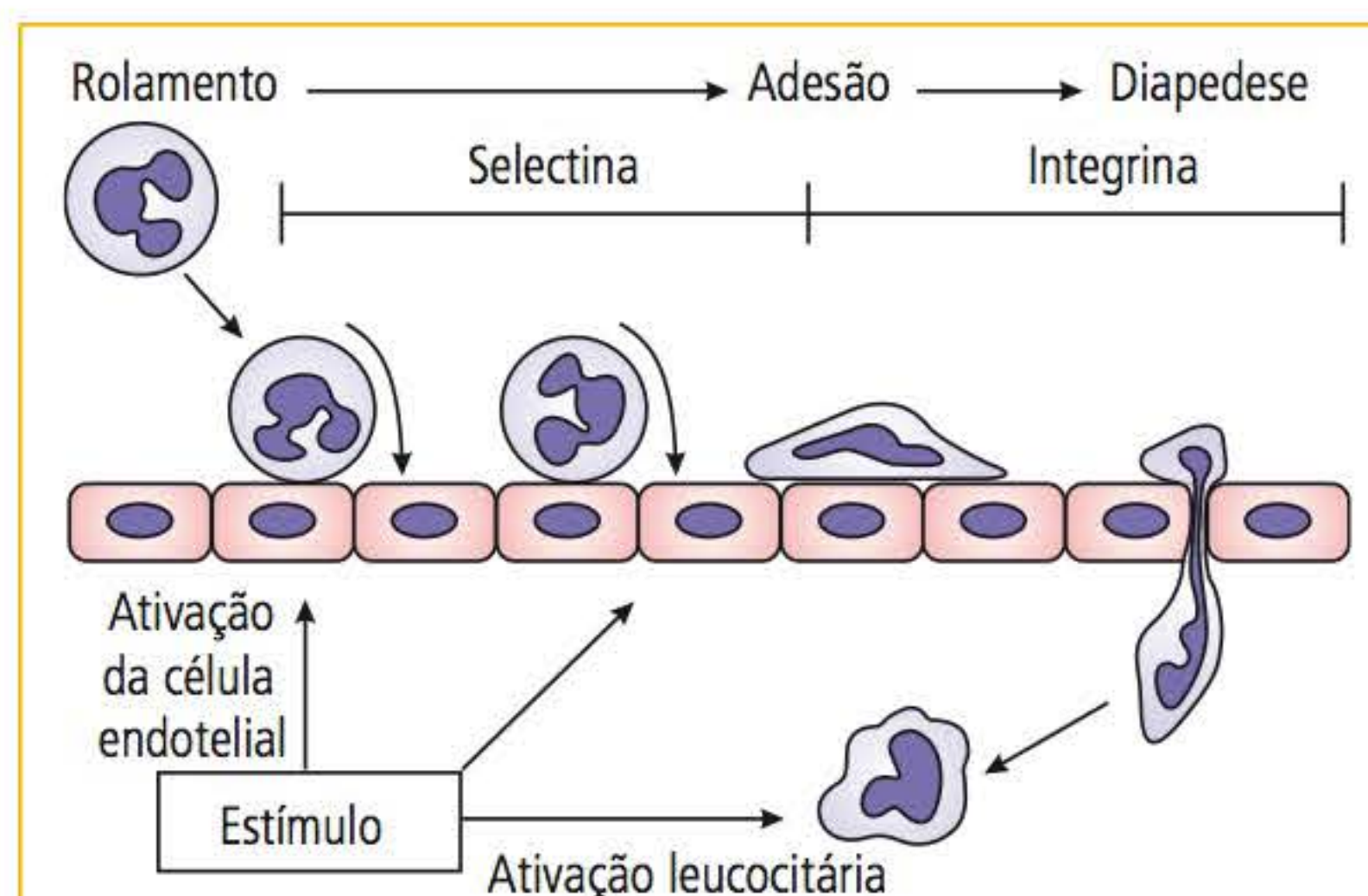
A fase vascular e exsudativa do processo inflamatório inicia logo após a lesão tissular. É caracterizada pela vasodilatação (aumento do fluxo sanguíneo no sítio inflamatório) e responsável pelo calor e rubor.<sup>1,2</sup> A **Figura 9.1** mostra uma comparação entre capilares normais e inflamados.

O aumento do fluxo sanguíneo no sítio inflamatório causa estase sanguínea com consequente aumento da permeabilidade vascular, da concentração eritrocitária e da viscosidade sanguínea. O aumento da permeabilidade vascular é caracterizado por uma separação maior entre a junção das células endoteliais, permitindo que o plasma, os anticorpos, as frações do complemento e as células (fagócitos) migrem ao sítio inflamatório formando



**FIGURA 9.1** Comparação entre capilares normais e inflamados.

o exsudato, que é o fluido extravascular inflamatório.<sup>1,2</sup> O exsudato é a causa do edema, e o pus caracteriza-se por ser um exsudato purulento, rico em leucócitos, principalmente neutrófilos.<sup>1,2</sup> Para que a célula possa migrar para o sítio inflamatório, deve fazer a diapedese. Inicialmente, a célula faz um movimento de rolamento sobre as células endoteliais, e essa ligação é mediada pelas selectinas. Posteriormente, a célula para o movimento e adere-se firmemente à célula endotelial, ligação essa feita pelas integrinas e, após essa ligação firme, efetua o movimento de diapedese. A **Figura 9.2** mostra o rolamento e a adesão dos neutrófilos à célula endotelial.

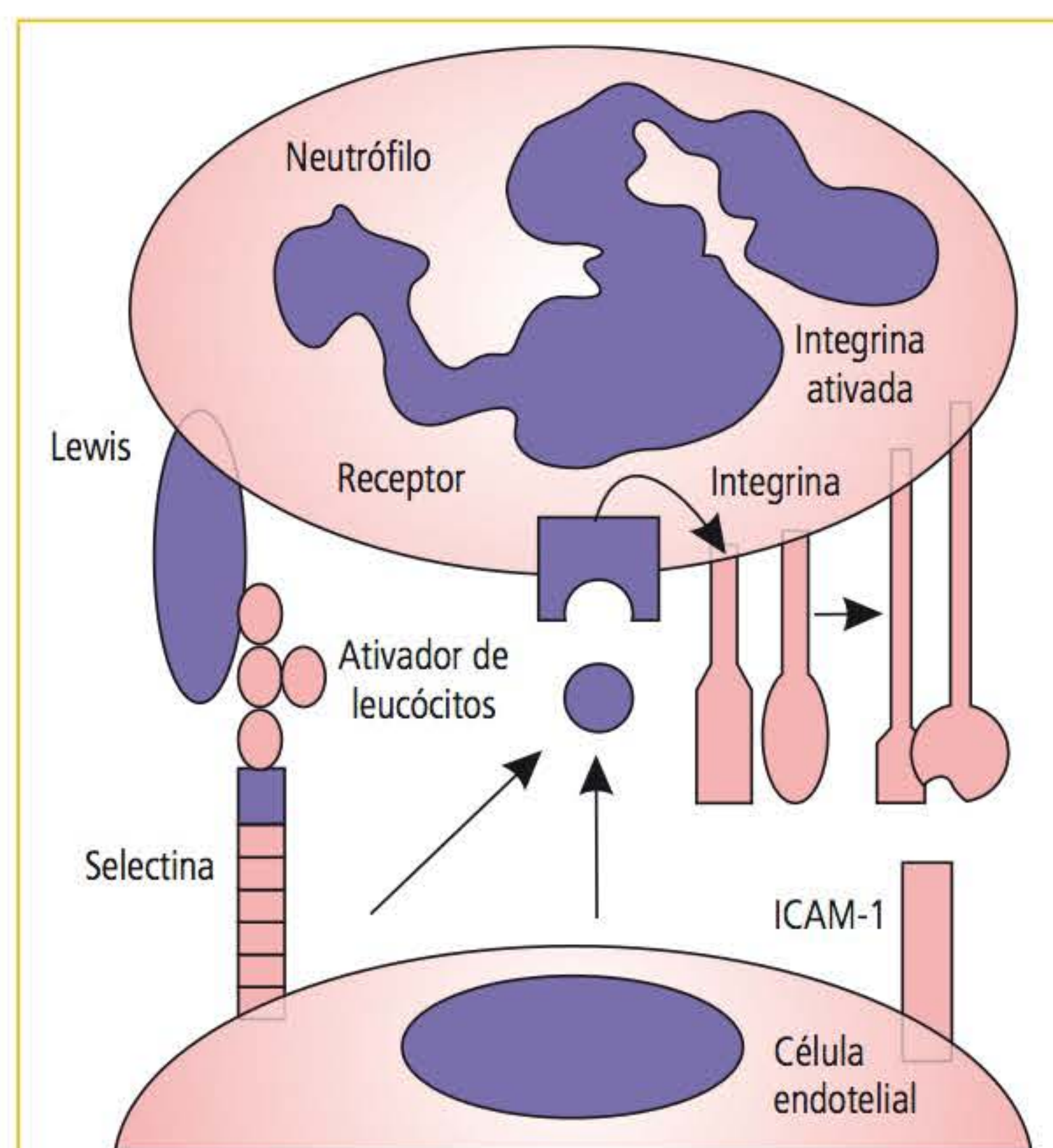


**FIGURA 9.2** Rolamento e adesão dos neutrófilos à célula endotelial.

As células endoteliais, quando ativadas, também expressam receptores para as integrinas, como ICAM-1 (CD54), CD11b/CD18 e CD11c/



CD18. As integrinas expressas pelo neutrófilo tornam-se ativadas e unem-se a seus receptores na célula endotelial. A **Figura 9.3** mostra a representação das selectinas e de um receptor de integrinas na célula endotelial e a expressão de integrinas no neutrófilo.



**FIGURA 9.3** Representação das selectinas e de um receptor de integrina na célula endotelial e a expressão de integrinas no neutrófilo.

Após estar firmemente aderido, o neutrófilo emite pseudópodos para iniciar o movimento ameboide, o qual se dá à custa da polimerização da actina e é regulado por várias proteínas e dependente de ATP.<sup>1,2</sup> Miosina, gelsolina, profilina, tubulina, timosinas e tropomiosinas também desempenham papel importante na contração do citoesqueleto.<sup>1,2</sup> Os neutrófilos, para migrarem ao sítio inflamatório, devem degradar a membrana basal; nesse momento, tornam-se ativados.<sup>1,2</sup> O controle de qual célula deve passar ao tecido está na dependência dos receptores de integrina expressos pela célula endotelial; isso explica a presença de diferentes células conforme o tipo de processo inflamatório. A diapedese ocorre principalmente em vênulas, exceto nos pulmões, onde também ocorre em capilares. Na maioria das formas das inflamações agudas, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas; após 24 a 48 horas, ocorre um predomínio de monócitos. Nas infecções virais,

ocorre predomínio de linfócitos e, nas reações de hipersensibilidade, de eosinófilos.

O processo de rompimento da membrana basal e migração ao tecido é chamado de quimiotaxia, que é uma locomoção originada por um gradiente químico.<sup>1,2</sup> A quimiotaxia é originada por substâncias endógenas ou exógenas. As endógenas são representadas pelos componentes do sistema complemento, produtos da via da lipo-oxigenase, e pelas citocinas. As exógenas são os produtos bacterianos, peptídeos que possuem a N-formil-metionina como aminoácido terminador.

Quando o fagócito chega ao sítio inflamatório, ele deve fazer a fagocitose da bactéria, processo que ocorre por opsonização (as opsoninas são as frações do complemento e os anticorpos) ou por receptores de manose ou galactose. Os neutrófilos expressam receptores para imunoglobulinas (FcγR) e para o complemento (CR); os receptores para manose e galactose são expressos em macrófagos e células dendríticas.<sup>1,2</sup> São descritos três receptores para os anticorpos: FcγR I (CD 64), FcγR II (CD32) e FcγR III (CD16).<sup>1,2</sup> O CD64 é membro da superfamília das imunoglobulinas, faz a mediação da NADPH oxidase e se expressa em monócitos e macrófagos. O CD32, também membro da superfamília das imunoglobulinas, além do papel na fagocitose, tem função no metabolismo oxidativo e está presente em monócitos, macrófagos e linfócitos B. O CD16, também presente em monócitos e macrófagos, diminui a afinidade do neutrófilo pelos anticorpos. O gene responsável pela síntese desses receptores está localizado no braço longo do cromossomo 1.

Os receptores para complemento são o CR1 (receptor para C3b), CR2 (receptor para C3d) e o receptor para C1q. A interiorização do patógeno ocorre pela ligação dos receptores de opsoninas (presentes na membrana dos neutrófilos) às opsoninas que recobrem o patógeno. A membrana citoplasmática dos neutrófilos emite pseudópodos para que haja a ligação de toda a membrana citoplasmática às opsoninas; com isso, a célula consegue englobar o patógeno. Essa ligação contínua da membrana às opsoninas lembra a ação de um zíper. A **Figura 9.4** traz a representação do processo de fagocitose.

Quando o patógeno é interiorizado, está formado o fagossomo, que se transforma em fagolisossomo quando os grânulos dos neutrófilos se fundem ao fagossomo. A morte e a digestão bacteriana podem



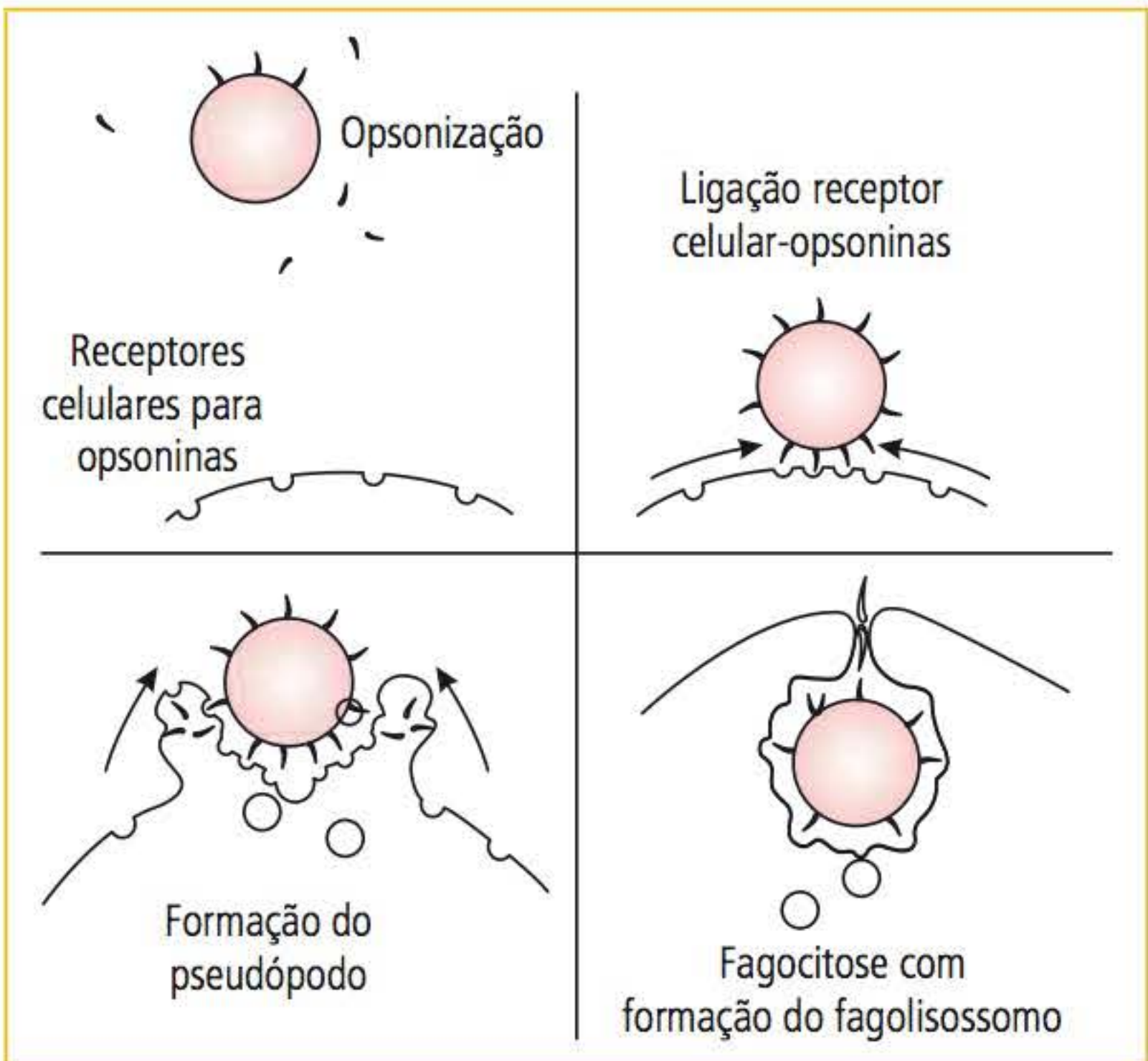


FIGURA 9.4 Representação do processo de fagocitose.

se dar pelo metabolismo oxidativo ou não oxidativo. A diferença entre eles é que o primeiro é dependente de oxigênio e o segundo não.<sup>1,2</sup>

O metabolismo oxidativo ocorre após a ativação dos neutrófilos, quando é gerada uma grande quantidade de oxigênio proveniente de substâncias liberadas das bactérias, como oligopeptídeos, frações do complemento e IL-8, resultando na produção de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>1,2</sup> A geração de oxigênio leva à produção de um complexo enzimático chamado de RBO (*respiratory burst oxidase*), que necessita de dois cofatores: FAD (dinucleotídeo adenina flavina) e o heme (hemeproteínas e citocromos presentes em grande quantidade nos neutrófilos). O RBO ativa a NADPH oxidase com formação de NADP<sup>+</sup> e H<sup>+</sup>; a NADPH oxidase é tanto encontrada na membrana citoplasmática quanto estocada dentro dos neutrófilos. A Figura 9.5 mostra a ativação da NADPH oxidase.

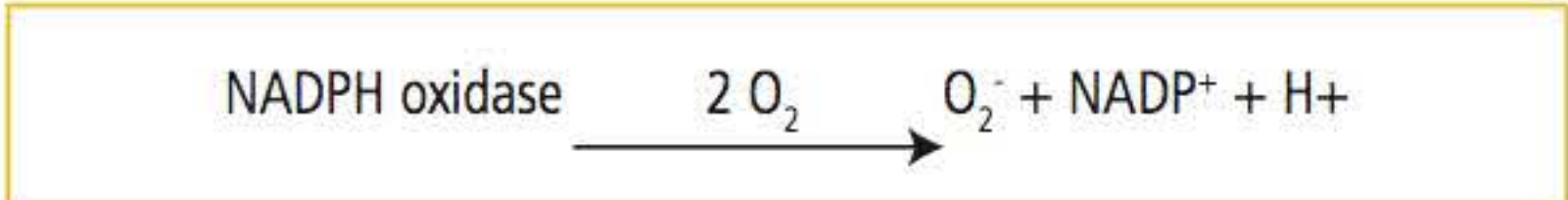


FIGURA 9.5 Ativação da NADPH oxidase.

O aumento de produção da NADP<sup>+</sup> leva à ativação do *shunt* das pentoses (via de Embden Meyerhof), aumentando a produção de NADP<sup>+</sup>. O O<sub>2</sub><sup>-</sup> é convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela ligação ao H<sup>+</sup>. Tanto o O<sub>2</sub><sup>-</sup> como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levam à morte bacteriana por gerarem radicais oxidantes bastante potentes.<sup>1,2</sup>

A mieloperoxidase (MPO), presente em grande concentração nos grânulos primários, é liberada no fagossomo durante a fusão do grânulo primário ao fagossomo e, junto com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, forma um halógeno oxidativo (CLO<sup>-</sup>), que é um bactericida eficaz e potente. A combinação da MPO, do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do CLO<sup>-</sup> é extremamente eficiente em promover a morte bacteriana.<sup>1,2</sup> A morte bacteriana pelo metabolismo oxidativo inclui a halogenação da parede celular bacteriana, a oxidação de componentes bacterianos, a descarboxilação dos aminoácidos da parede bacteriana e a geração de cloraminas com atividade bactericida.<sup>1,2</sup> Aproximadamente 20% dos pacientes com deficiência da MPO apresentam um aumento na susceptibilidade a infecções bacterianas. Essa porcentagem reduzida é explicada pela menor concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

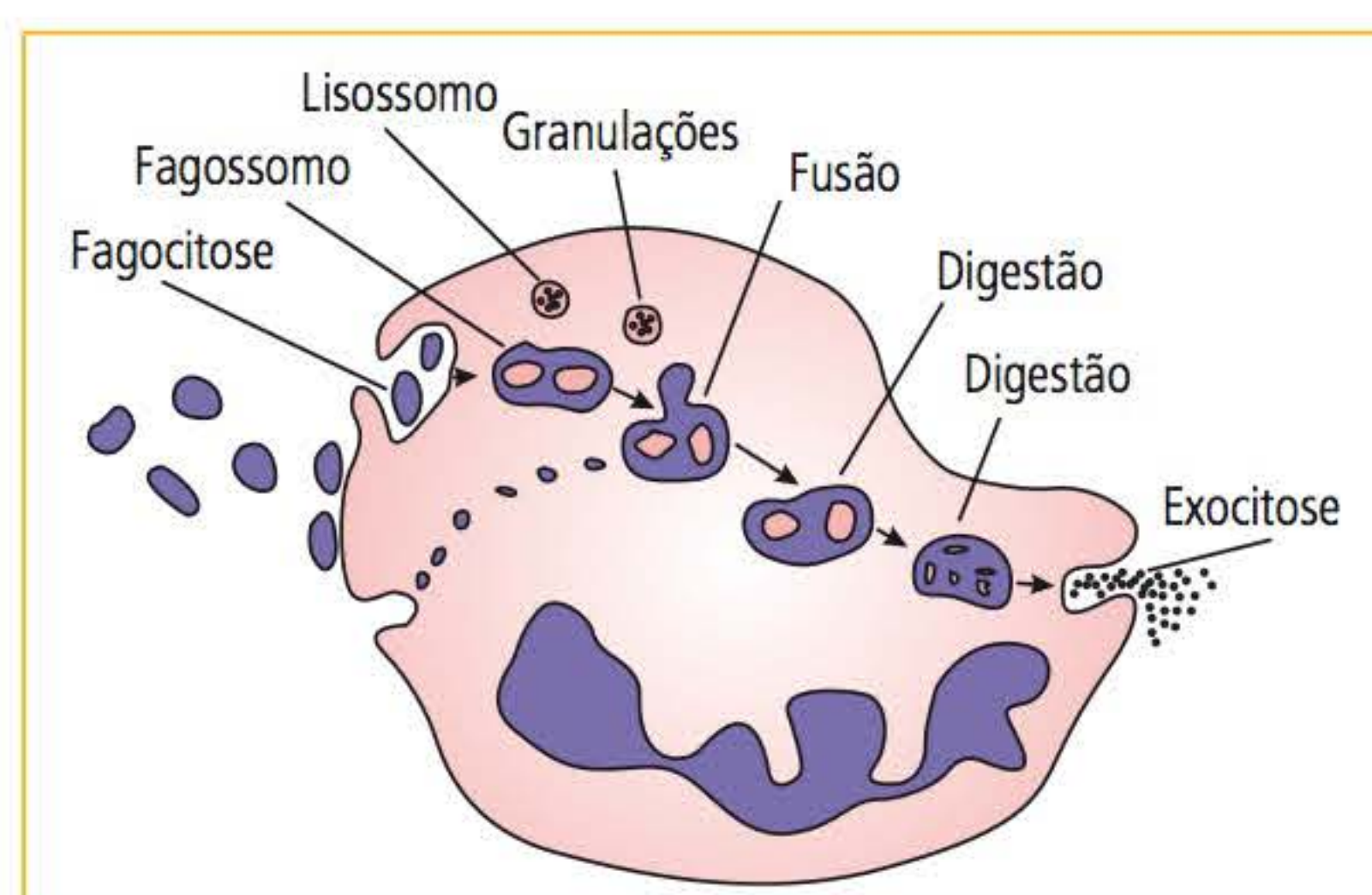
A morte e a digestão bacteriana pelo metabolismo não oxidativo estão baseadas nas substâncias presentes nos grânulos dos neutrófilos. O Quadro 9.1 traz as principais substâncias presentes nos grânulos dos neutrófilos que participam do metabolismo não oxidativo.

QUADRO 9.1 Principais substâncias do sistema bactericida independente do metabolismo oxidativo e suas características

SUBSTÂNCIA	CARACTERÍSTICAS
Lisozima	Presentes em grânulos primários e secundários. Hidrolisa a parede celular de certas bactérias. A maioria das bactérias é resistente à ação direta da lisozima, torna-se mais sensível após a exposição a complemento, anticorpos e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Lactoferrina	Inibe o crescimento bacteriano ao se ligar a um nutriente essencial, o ferro. Essa propriedade é mantida mesmo em pH ácido. O pH no interior do fagossomo varia de 3,5-6,5
BPI (do inglês <i>bactericidal permeability-increasing protein</i> )	São proteínas que aumentam a permeabilidade da membrana bacteriana. Apresentam propriedade bactericida contra bactérias gram-negativas
Defensinas	Pequenos peptídeos que destroem uma variedade de bactérias, fungos e vírus

Após a morte da bactéria, ela é digerida, e o resultado da degradação bacteriana é liberado ao meio externo pelo processo da exocitose. A Figura 9.6 faz uma representação do processo da fagocitose e exocitose.





**FIGURA 9.6** Processo da fagocitose e exocitose.

A resolução do processo inflamatório inicia-se quando há um predomínio dos mediadores anti-inflamatórios, porque na vigência do processo infeccioso há predomínio de mediadores pró-inflamatórios; muitos mediadores apresentam as duas ações: a escolha de uma ou outra depende do receptor em que atuam.

### FISIOPATOLOGIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO CRÔNICO

A inflamação crônica pode ser definida como um processo inflamatório de duração longa e, ao contrário da inflamação aguda, inicia de modo insidioso e assintomático.<sup>1,2</sup> Ocorre em infecções crônicas e em inflamações crônicas não infecciosas.<sup>3</sup> O primeiro grupo é representado por infecções pulmonares (abscessos, enfisema, tuberculose e pneumonia), endocardite bacteriana subaguda, doença inflamatória da pelve, osteomielite, infecção urinária crônica, infecção crônica por fungo, infecções persistentes pelo treponema, meningite e síndrome da imunodeficiência. No segundo grupo estão incluídas doenças como artrite reumatoide, febre reumática, lúpus eritematoso sistêmico, aterosclerose e vasculite.

Ao contrário da inflamação aguda, que se caracteriza por edema, rubor, calor e infiltração por neutrófilos, a inflamação crônica caracteriza-se por um infiltrado de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas), por destruição celular induzida pelas células inflamatórias e por angiogênese e fibrose, na tentativa de reparar o tecido lesado.<sup>4</sup> No processo infeccioso agudo, a ativação do macrófago termina quando o agente infeccioso é eliminado. No processo inflamatório crônico, como o agente que está causando a lesão tecidual é persistente, o macrófago está permanentemente ativado e prolifera no sítio

inflamatório. O macrófago ativado secreta citocinas e fatores de crescimento que são quimiotáticos para os monócitos, os quais são recrutados em maior número e constantemente a partir do sangue periférico.<sup>4</sup> O macrófago é a célula central do processo inflamatório crônico devido às substâncias que ele secreta, as quais são tóxicas para o tecido, como os metabólitos provenientes do metabolismo oxidativo, proteases que degradam a matriz extracelular, citocinas que atraem outras células ao sítio inflamatório e fatores de crescimento que aumentam a proliferação de fibroblastos (fibrose) e a deposição de colágeno.<sup>4</sup> Os linfócitos se fazem presentes no sítio inflamatório mesmo que a lesão não seja de causa imune, porque o macrófago secreta citocinas quimiotáticas aos linfócitos, que, uma vez no sítio inflamatório, produzem citocinas, como IFN- $\gamma$ , que estimulam os macrófagos.<sup>4</sup> Nesse ponto, fecha-se um círculo vicioso de ativação de macrófagos e linfócitos. Os eosinófilos fazem-se presentes em grande número no sítio inflamatório quando o agente é um parasita ou nas reações imunes.<sup>4</sup> Os neutrófilos podem estar presentes em grande número nas infecções bacterianas crônicas, como na osteomielite e também na doença pulmonar crônica.<sup>4</sup>

O hemograma na inflamação crônica apresenta leucocitose discreta e persistente, a análise morfológica diferencial pode apresentar neutrofilia sem ou com discreto desvio nuclear à esquerda.<sup>1,2</sup> O quadro leucocitário pode manifestar linfocitose com discreta leucocitose ou monocitose isolada, ou em associação com linfocitose e/ou linfopenia, ou ainda associada com neutrofilia.<sup>1,2</sup> O quadro eritrocitário pode mostrar anemia discreta normocítica e normocrômica não hemolítica, caracterizando o quadro eritrocitário de anemias de doenças crônicas.<sup>1,2</sup>

### CAUSAS DE NEUTROFILIA E NEUTROPENIA

As causas de neutrofilia podem ser fisiológicas e representadas pelo estresse biológico ou emocional que ocorrem por desmarginação do subcompartimento marginal. São caracterizadas por leucocitose à custa de neutrofilia e sem desvio nuclear à esquerda, podendo ser por represamento, como o que ocorre na presença de glicocorticoides.<sup>1,2</sup>

As neutrofilias não fisiológicas ocorrem nas infecções agudas localizadas ou sistêmicas e são



causadas por cocos, bacilos, fungos, parasitas e algumas viroses e, em algumas inflamações, como lesão tissular, por procedimento cirúrgico, queimaduras, infarto do miocárdio, crise de gota e reações de hipersensibilidade. Nessas situações, a resposta leucocitária é de leucocitose à custa de neutrofilia com desvio nuclear à esquerda variável e com a presença ou não de precursores mieloides. Podem, ainda, apresentar granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacúolos.<sup>1,2</sup> Nessas situações, além da desmarginação, ocorre liberação do compartimento de reserva da medula óssea (compartimento pós-mitótico) e aumento da produção dos neutrófilos.<sup>1,2</sup> O quadro hematológico descrito é de uma produção medular maior que o consumo tecidual. O **Quadro 9.2** descreve as alterações hematológicas quando a produção é maior que o consumo.

QUADRO 9.2 Alterações hematológicas quando a produção é maior que o consumo	
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Leucocitose</li><li>▪ Neutrofilia</li><li>▪ Desvio nuclear à esquerda</li><li>▪ Precursores mieloides*</li><li>▪ Linfopenia</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Monocitose</li><li>▪ Granulações tóxicas*</li><li>▪ Corpúsculos de Döhle*</li><li>▪ Vacúolos citoplasmáticos*</li><li>▪ Reação leucemoide**</li></ul>

\*Podem não ser visualizados. \*\*Pode ocorrer.

Nas inflamações crônicas, podem ocorrer leucocitose e neutrofilia discretas com ou sem DNE. Isso ocorre porque as inflamações crônicas são insidiosas, o que permite que haja um equilíbrio entre a produção medular e o consumo tecidual.<sup>1,2</sup> Nas alterações metabólicas, nos envenenamentos por substâncias como chumbo, mercúrio, benzeno, medicamentos, veneno de insetos e reações de hipersensibilidade, pode ocorrer leucocitose à custa de neutrofilia com ou sem DNE, dependendo da necrose tecidual.<sup>1,2</sup> Esse quadro hematológico ocorre pela desmarginação, pela liberação do compartimento de reserva da medula óssea e por aumento de produção.<sup>1,2</sup> Nos quadros de hemorragia aguda, a leucocitose à custa de neutrofilia pode ocorrer entre 1 a 2 horas após o início da hemorragia devido à desmarginação dos neutrófilos. Após 3 a 6 horas do início da hemorragia (caso essa persista por esse tempo), ocorre a liberação do compartimento de reserva da medula óssea com o aparecimento do DNE.<sup>1,2</sup> Nas crises hemolíticas, pode ocorrer leucocitose à custa de neutrofilia devido à desmarginação e, dependendo da intensidade da crise

hemolítica, pode haver liberação do compartimento de reserva da medula óssea com DNE e pelo aumento da produção de neutrófilos.<sup>1,2</sup>

Embora as causas de neutropenia sejam detalhadas adiante, neste momento, é importante ressaltar que, durante o curso de um processo infeccioso bacteriano, pode ocorrer um quadro hematológico em que o consumo tecidual suplante a capacidade de produção da medula óssea, o que caracteriza um quadro de leucopenia com neutropenia e com manutenção do DNE e de precursores mieloides.<sup>1,2</sup> O **Quadro 9.3** descreve as alterações hematológicas quando a produção é menor que o consumo.

Não obstante sejam traçadas linhas de raciocínio que utilizem o desvio nuclear à esquerda como um dos critérios para o estabelecimento de um processo infeccioso bacteriano agudo, alguns trabalhos publicados recomendam o abandono da contagem de bastões com esse fim. Em 2006, o grupo de trabalho em hematologia da Associação Canadense de Qualidade em Medicina Laboratorial (CCQLM) publicou uma recomendação prática com o título “Toward Abandoning The Band – A practice recommendation of the CCQLM”.<sup>5</sup> Nesse trabalho, foi descrita a grande variação estatística que ocorre nas contagens de bastões em protocolos intralaboratoriais. Essa variação se deve ao fato da grande variabilidade de definições que existem para caracterizar morfológicamente essa célula. Sendo assim, o trabalho conclui que a contagem de bastonetes deve ser abandonada devido as contagens não serem robustas analiticamente, bem como clinicamente relevantes na discriminação entre um processo infeccioso e um processo não infeccioso. Além disso, conclui o trabalho que a contagem de neutrófilos e a presença de precursores mieloides (ou granulócitos imaturos) são os parâmetros mais indicados para caracterizar o processo infeccioso bacteriano agudo.<sup>5,6</sup>

QUADRO 9.3 Alterações hematológicas quando a produção é menor que o consumo	
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Leucopenia</li><li>▪ Neutropenia</li><li>▪ DNE</li><li>▪ Precursores mieloides</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Linfopenia</li><li>▪ Granulações tóxicas*</li><li>▪ Corpúsculos de Döhle*</li><li>▪ Vacúolos citoplasmáticos*</li></ul>

\*Podem não ser visualizados

Para que o paciente seja considerado como neutropênico, ele deve ter uma contagem de



neutrófilos abaixo de 1.500 neutrófilos/ $\mu$ L. A intensidade da neutropenia pode ser correlacionada com a propensão de o paciente desenvolver um processo infeccioso. Entre 1.000 a 1.500 neutrófilos (neutropenia discreta),<sup>3</sup> não há uma probabilidade significativa de o paciente desenvolver um quadro infeccioso; entre 500 e 1.000 (neutropenia moderada)<sup>3</sup> a probabilidade aumenta bastante e, abaixo de 500 neutrófilos (neutropenia intensa),<sup>3</sup> a probabilidade de desenvolver um quadro infeccioso é bastante significativa.<sup>7</sup> O risco de desenvolver um processo infeccioso está correlacionado com a intensidade e com o período de duração da neutropenia.<sup>3</sup> As neutropenias podem ser classificadas como de causa primária ou adquirida.<sup>7</sup> O **Quadro 9.4** relaciona as neutropenias de causa primária e de causa adquirida.

QUADRO 9.4 Relação das neutropenias de causa primária e de causa adquirida	
CAUSA ADQUIRIDA	CAUSA PRIMÁRIA
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Infecções</li><li>▪ Induzida por drogas</li><li>▪ Neutropenia crônica benigna</li><li>▪ Neutropenia crônica benigna da infância e adolescência</li><li>▪ Neutropenia autoimune</li><li>▪ Neutropenia neonatal</li><li>▪ Síndrome de Felty</li><li>▪ Neutropenia nas doenças metabólicas</li><li>▪ Devido ao aumento de marginação</li><li>▪ Hiperesplenismo</li><li>▪ Deficiência nutricional</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Neutropenia familiar benigna</li><li>▪ Neutropenia crônica idiopática e não imunológica</li><li>▪ Neutropenia congênita grave</li><li>▪ Neutropenia cíclica</li><li>▪ Neutropenia na síndrome de Chédiak-Higashi</li></ul>

Nas infecções virais, é comum a ocorrência de neutropenia, que se instala por deficiência na produção medular, por redistribuição dos neutrófilos nos vários compartimentos e mesmo pela destruição dos neutrófilos,<sup>7</sup> a qual decorre de uma ação direta do vírus sobre os neutrófilos. A neutropenia também pode ser induzida por anticorpos antineutrófilos,<sup>7</sup> que são produzidos por indução viral. As doenças virais que estão relacionadas com neutropenia são varicela, sarampo, rubéola, hepatites A e B, mononucleose infecciosa, vírus da *influenza*, parvovírus B<sub>19</sub> e o citomegalovírus.<sup>7</sup> Na Aids, aproximadamente 70% dos pacientes apresentam leucopenia cujas causas são

o hiperesplenismo e a produção de anticorpos antineutrófilos.<sup>7</sup> Apesar de ser comum a ocorrência de neutropenia nos processos infecciosos virais, raramente tem significado clínico.<sup>3</sup> A neutropenia nos processos infecciosos bacterianos pode ser causada por depleção do compartimento pós-mitótico e do subcompartimento marginal por uma demanda tecidual muito grande, levando a um quadro hematológico em que a produção é menor que o consumo. Nas septicemias causadas por bactérias gram-negativas, a neutropenia pode ser causada pela supressão da produção de neutrófilos pela medula óssea, destruição dos neutrófilos e diminuição na produção dos fatores de crescimento para a linhagem neutrofílica, que ocorre pela ação das toxinas bacterianas.<sup>3</sup> Pacientes que têm dificuldade de fazer a produção (medula óssea) de neutrófilos, como recém-nascidos, alcoolistas e em quimioterapia ou radiação, fazem neutropenias intensas frente a infecções bacterianas graves.<sup>3</sup>

Os medicamentos podem causar neutropenia por vários mecanismos. Pode haver uma supressão da medula óssea por ação direta da droga destruindo precursores celulares ou lesando o microambiente medular;<sup>3</sup> o neutrófilo pode ser destruído via indução de anticorpos ou por ativação do sistema complemento<sup>7</sup> e inibição dos fatores de crescimento, como CFU-GM.<sup>3</sup>

A neutropenia crônica benigna ocorre em adolescentes e adultos. Caracteriza-se por ter um número de neutrófilos entre 200 a 500/ $\mu$ L e apresenta uma evolução benigna. A medula óssea desses pacientes revela uma quantidade normal ou até aumentada de precursores neutrofílicos, e o que se observa é uma parada de maturação no estágio de metamielócito ou bastonete. Com frequência, esses pacientes apresentam monocitose.<sup>7</sup>

A neutropenia crônica benigna da infância e adolescência é caracterizada por aumento de precursores dos neutrófilos e depleção da forma madura. Esses pacientes podem apresentar neutropenia intensa com valores abaixo de 200 neutrófilos/ $\mu$ L.<sup>7</sup> Não apresentam predisposição para processos infecciosos, mesmo quando a neutropenia persiste por vários meses.<sup>7</sup>

A neutropenia autoimune pode ser idiopática (causa primária),<sup>3</sup> estar relacionada ou ser secundária<sup>3</sup> a doenças autoimunes, estar associada com infecções ou com medicamentos.<sup>7</sup> A medula óssea



apresenta aumento dos precursores dos neutrófilos mas com perda de maturação a neutrófilo.<sup>7</sup>

A neutropenia neonatal ocorre em dois a cada 1.000 nascimentos,<sup>7</sup> e o mecanismo é o mesmo da doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade pelo sistema sanguíneo Rh. A mãe forma anticorpos do tipo IgG contra os neutrófilos, que atravessam a placenta e levam à destruição imunológica.<sup>7</sup>

A síndrome de Felty é uma artrite reumatoide crônica associada com esplenomegalia, neutropenia e, ocasionalmente, anemia e trombocitopenia e é mais comum em pacientes com doença crônica de longo tempo.<sup>8</sup> Complexos imunes são vistos com frequência e há evidências de consumo de complemento;<sup>8</sup> a neutropenia pode ser moderada. A medula óssea mostra-se hipercelular com diminuição na quantidade de neutrófilos. Além da causa imunológica, a neutropenia também pode ser devida ao hiperesplenismo.<sup>8</sup> Os pacientes com síndrome de Felty têm uma frequência alta de processos infecciosos que estão associados à intensidade da neutropenia.<sup>8</sup>

A neutropenia pode estar associada com cetoadicose em pacientes com hiperglicemia, hiperglicinúria, acidúria orótica e acidúria metilmalônica.<sup>7</sup>

Neutropenias aguda e crônica podem ocorrer em pacientes com disfunção pulmonar e pacientes submetidos à hemodiálise. Nas duas situações, a neutropenia é consequência da ativação do complemento. A fração C<sub>5a</sub> gerada durante a ativação da cascata do complemento promove aumento da aderência e agregação dos neutrófilos e também uma passagem maior para o tecido pulmonar.<sup>7</sup>

A neutropenia devido ao hiperesplenismo caracteriza-se por ser discreta, não causa sintomas clínicos e geralmente está associada com anemia e trombocitopenia.<sup>7</sup>

As deficiências de vitamina B<sub>12</sub> e folato são causas de neutropenia porque comprometem a divisão celular pela falta da timina. Deve ser ressaltado que, nessa deficiência nutricional, outras citopenias (bicitopenias: neutropenia e anemia; neutropenia e trombocitopenia) ou um quadro de pancitopenia (neutropenia, anemia e trombocitopenia) podem ocorrer.

A neutropenia familiar benigna está associada a determinados grupos étnicos, é de evolução benigna e não está relacionada com infecções recorrentes. A neutropenia é discreta, com valores de neutrófilos variando entre 800 a 1.400 neutrófilos/ $\mu$ L.<sup>7</sup>

A neutropenia crônica idiopática e não imunológica é característica de adultos, benigna e com neutropenia discreta.<sup>7</sup>

A neutropenia congênita grave caracteriza-se por ter uma neutropenia intensa e associada com infecções graves recorrentes. É descrita como uma herança tanto autossômica como dominante. A medula óssea revela-se hipoplásica com parada de maturação no estágio de pró-mielócito.<sup>7</sup>

A neutropenia cíclica é uma doença rara de herança dominante e que se caracteriza por ciclos de neutropenia que ocorrem a cada 21 dias em 90% dos pacientes, os quais apresentam febre recorrente, faringite, estomatite e infecções bacterianas.<sup>7</sup> Nos períodos de neutropenia, a medula óssea mostra-se hipoplásica com parada de maturação no estágio de mielócito. O diagnóstico da neutropenia cíclica deve ser feito com leucogramas de controle, que devem ser realizados 2 ou 3 vezes por semana, durante oito semanas.<sup>7</sup> O período de neutropenia varia entre 3 a 5 dias, e a contagem de neutrófilos pode ficar entre 200 a 300 neutrófilos/ $\mu$ L.<sup>7</sup>

A síndrome de Chédiak-Higashi caracteriza-se, citologicamente, por apresentar grânulos gigantes nas células hematopoiéticas, e a neutropenia ocorre por granulopoiese ineficaz.<sup>7</sup> A **Figura 9.7** mostra um esquema de como investigar pacientes com neutropenia persistente.

### CAUSAS DE MONOCITOSE E MONOCITOPENIA

Como todas as células da contagem diferencial, a contagem de monócitos deve ser interpretada pelo valor absoluto. Monocitopenia é encontrada em duas situações: na anemia aplástica e na tricoleucemia, mas em ambas ocorre pancitopenia. Pode ocorrer monocitopenia na vigência de corticoides, o que explica a predisposição desses pacientes a processos infecciosos. Monocitopenia isolada não ocorre. A monocitose é uma manifestação frequente em certas infecções bacterianas, está acompanhada de neutrofilia e linfopenia e ocorre em inflamações crônicas, doenças imunes (lúpus eritematoso e artrite reumatoide), tuberculose, endocardite bacteriana, sífilis, brucelose, estados neutropênicos (agranulocitose), listeriose, recuperação de infecções agudas, malária, febre tifoide, síndromes mielodisplásicas, doenças mieloproliferativas, carcinoma de ovário, estômago e mama.<sup>1,2</sup> Na endocardite bacteriana, sífilis e brucelose, ocorre monocitose



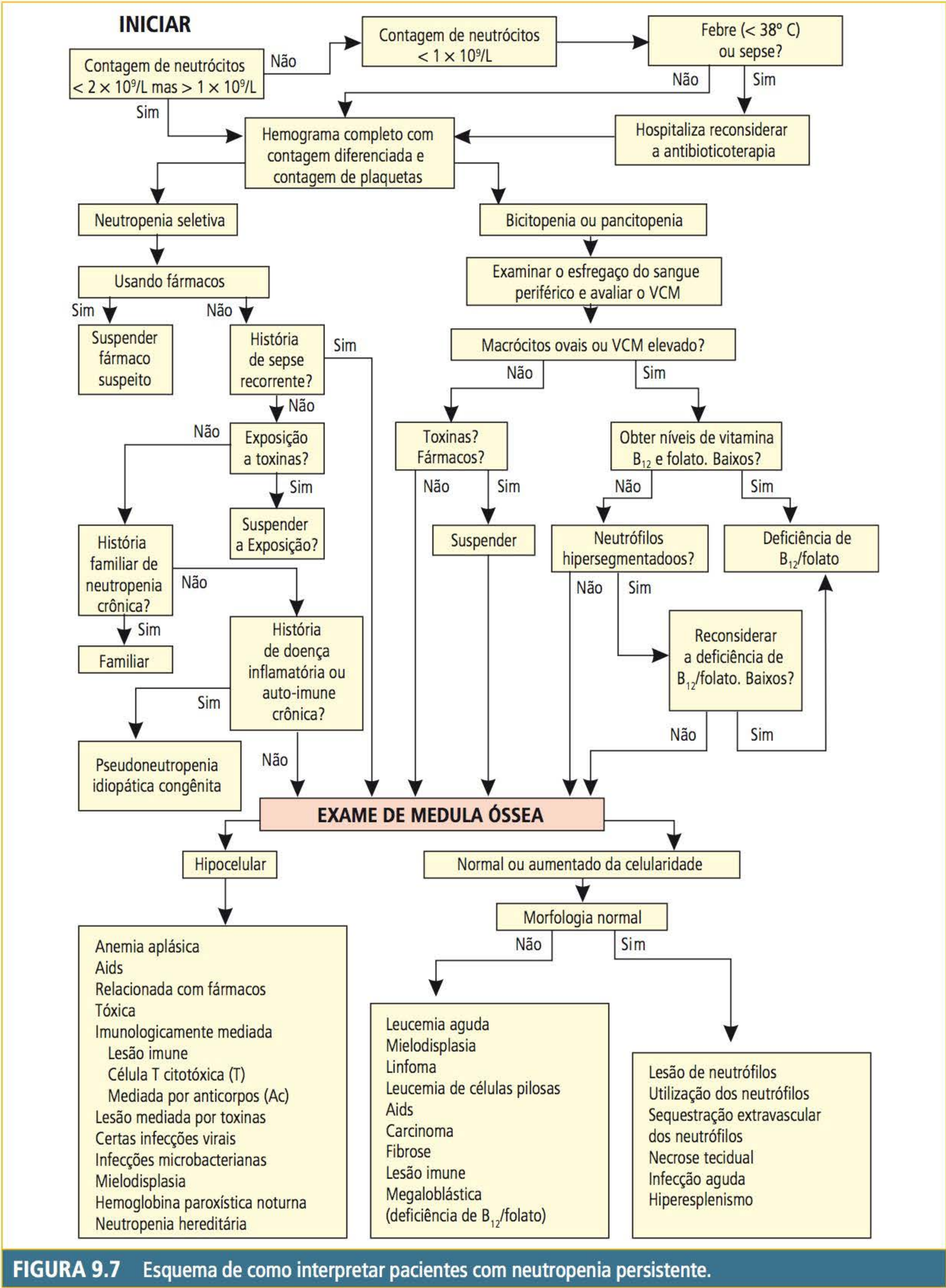


FIGURA 9.7 Esquema de como interpretar pacientes com neutropenia persistente.

sem leucocitose.<sup>1,2</sup> A relação monócitos/linfócitos é de 0,3:1 em contagens diferenciais normais; na tuberculose, o número de monócitos pode ser muito

alto e exceder o número de linfócitos; a relação de 0,8:1 ou maior indica um prognóstico não favorável.<sup>1,2</sup> A monocitose é transitória na recuperação de



infecções agudas.<sup>1,2</sup> Na úlcera gástrica ou duodenal e na fase de recuperação de agranulocitose, a monocitose é observada e também é relatada em crianças e adolescentes com infecções virais.<sup>1,2</sup> Leucemias monocíticas agudas e crônicas têm um predomínio de monócitos em medula óssea e sangue periférico; ocasionalmente, a monocitose persistente pode preceder o início de uma leucemia mieloide aguda.

### LEUCOGRAMA NOS PROCESSOS INFECCIOSOS BACTERIANOS, INFLAMATÓRIOS E INFECÇÕES POR PROTOZOÁRIOS

#### :: PROCESSOS AMIGDALIANOS

Os processos amigdalianos são agudos, causados principalmente por bactérias como estreptococos e pneumococos e cursam com dor local, principalmente na deglutição, febre, edema e coleção purulenta.<sup>1,2</sup> O hemograma apresenta leucocitose variável, geralmente com valores acima de 10.000 leucócitos/ $\mu$ L, com desvio nuclear à esquerda variável.<sup>1,2</sup> Podem estar presentes monocitose, granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle.<sup>1,2</sup> O quadro hematológico é resultado da desmarginação neutrofílica seguida da liberação dos neutrófilos do compartimento pós-mitótico. Essa interpretação baseia-se em crianças ou adultos com boas condições de saúde; pacientes debilitados ou imunodeprimidos podem apresentar leucopenia, neutropenia e desvio nuclear à esquerda.<sup>1,2</sup> É difícil o laboratório realizar hemograma em processos amigdalianos porque a clínica é exuberante, principalmente em abscesso purulento, e a antibioticoterapia é instalada de imediato.<sup>1,2</sup>

#### :: APENDICITE

Os sintomas da apendicite iniciam com dor abdominal do tipo visceral, resultante das contrações apendiculares. Com a disseminação do processo inflamatório para as superfícies peritoneais, a dor torna-se mais intensa, agravando-se pelo movimento ou tosse. Em geral, está localizada na fossa ilíaca direita.<sup>1,2</sup> Anorexia é frequente, com náuseas e vômitos em 60% dos casos, e o quadro febril varia entre 37,2 a 38 °C.<sup>1,2</sup> O leucograma apresenta leucocitose (que varia entre 10.000 a 18.000 leucócitos/ $\mu$ L) à custa de neutrofilia com desvio nuclear à esquerda, podendo apresentar precursoros mieloides. Quando o número de leucócitos está acima de

20.000 leucócitos/ $\mu$ L, deve-se pensar na possibilidade de perfuração.<sup>1,2</sup> O quadro hematológico de apendicite pode cursar com ausência de leucocitose e de desvio nuclear à esquerda.<sup>1,2</sup> O exame parcial de urina deve ser realizado porque muitas infecções geniturinárias podem simular um quadro de apendicite.<sup>1,2</sup> A leucocitose com neutrofilia e desvio nuclear à esquerda é um achado consistente com a evolução da doença; por isso, costuma-se fazer hemogramas de controle para avaliar a evolução da doença e caracterizá-la, mas pode não haver alteração do quadro hematológico.<sup>1,2</sup> Dois casos laboratoriais podem exemplificar a apendicite: no primeiro caso, um homem de 32 anos, cirurgia-geral, foi acometido por uma dor intensa e constante na fossa ilíaca direita, perda de apetite, náuseas e mal-estar geral. A dor agravava-se ao movimento. Com suspeita de apendicite, foi solicitado hemograma. O resultado mostrou um eritrograma normal, 6.400 leucócitos/ $\mu$ L, sem desvio nuclear à esquerda e sem neutrofilia. Após seis horas, o paciente continuava apresentando os mesmos sintomas. Novo hemograma foi realizado e não houve alteração do quadro leucocitário. O paciente foi submetido à apendicectomia. O segundo caso é de um estudante, 18 anos, que chegou ao ambulatório médico com relato de dor abdominal intensa, náuseas, episódios de vômito, mal-estar geral e dificuldade para caminhar. Foi solicitado parcial de urina com sedimento corado e hemograma. O exame de urina foi normal, sem presença de bactérias. No hemograma, a série vermelha estava normal, e o quadro leucocitário mostrou uma contagem de leucócitos de 18.000 leucócitos/ $\mu$ L com neutrofilia e DNE (18 bastonetes), monocitose, linfopenia, granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle nos neutrófilos. O paciente foi submetido à apendicectomia. Em casos de dor abdominal, deve-se pensar em apendicite e, se no início da instalação da doença não há alteração do quadro leucocitário, é comum fazer o controle do leucograma para avaliar a evolução do quadro clínico e hematológico. **A velocidade de hemossedimentação (VHS) é pouco sensível e inespecífica na apendicite aguda porque pode não se alterar; o leucograma e a PCR são preferíveis à VHS.**<sup>2</sup>

#### :: ARTRITE INFECCIOSA

Os patógenos mais comuns associados à artrite infecciosa são *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* e os estreptococos, patógenos que



podem ganhar a corrente circulatória a partir de infecções ósseas ou de tecidos moles ou serem inoculados de modo direto em procedimentos cirúrgicos, injeções ou traumatismos.<sup>1,2</sup> As articulações mais acometidas são os joelhos, e com menor frequência, quadril, ombro, pulso e cotovelos.<sup>1,2</sup> Os sinais clínicos são de dor intensa e uniforme ao redor da articulação, espasmo muscular, amplitude de movimento diminuída e febre entre 38,3 a 38,9 °C. Pela ativação dos macrófagos residentes na articulação, uma grande quantidade de neutrófilos migra ao sítio inflamatório e passa a predominar no líquido sinovial, que, durante o processo infeccioso, apresenta contagem leucocitária que varia de 25.000 a 250.000 leucócitos/ $\mu$ L com mais de 90% de neutrófilos.<sup>1,2</sup> O leucograma pode apresentar leucocitose à custa de neutrofilia com ou sem DNE e monocitose.

## ■ ARTRITE REUMATOIDE

É uma doença inflamatória crônica de causa imunológica (autoimune), que tem como principal sítio as articulações, nas quais causa uma destruição tecidual progressiva com vários graus de deformidade e incapacidade funcional.<sup>1,2</sup> As mulheres são cerca de três vezes mais afetadas que os homens.<sup>1,2</sup> A causa da artrite reumatoide (AR) é desconhecida; uma das hipóteses é que ela inicie a partir de um agente infectante, como micoplasma, EBV, citomegalovírus, parvovírus e o vírus da rubéola. Esses patógenos infectam as estruturas articulares ou há retenção de produtos microbianos na articulação, o que gera um processo inflamatório crônico com ativação do sistema imunológico e geração de anticorpos contra as estruturas articulares.<sup>8</sup> Pacientes com artrite reumatoide apresentam com frequência anticorpos contra colágenos do tipo II.<sup>1,2</sup> Outra possibilidade é a presença de superantígenos, produzidos por determinados microrganismos, que ativariam os linfócitos T, desencadeando uma resposta imunológica crônica.<sup>8</sup> O único fator ambiental que está associado com o desenvolvimento da AR é o hábito de fumar.<sup>8</sup> Em 55 a 70 % dos pacientes, a doença começa de forma insidiosa, com sintomas clínicos não característicos, como astenia, debilidade e dores musculoesqueléticas generalizadas; posteriormente, ocorrem as manifestações articulares: dor articular, rigidez matutina nas articulações, articulações tumefatas, quentes e eritematosas.<sup>1,2</sup> As manifestações extra-articulares caracterizam-se

por nódulos linfáticos (manifestação mais frequente e caracterizada, histologicamente, por uma zona central de necrose, rodeada por histiócitos, células epitelioides e infiltrado inflamatório crônico), vasculite reumatoide, pericardite e derrame pleural.<sup>1,2</sup>

A artrite reumatoide é mediada por interações entre células do endotélio vascular, neutrófilos, linfócitos T e B e macrófagos. A ativação dessas células ocorre a partir de citocinas secretadas pelos macrófagos, entre elas TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), interleucinas 1, 6, 8, TGF- $\beta$  (fator de crescimento celular  $\beta$ ), GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *platelet-derived growth factor*).<sup>1,2</sup> Essas citocinas, inicialmente, recrutam para o sítio inflamatório os neutrófilos, que, posteriormente, são substituídos pelos linfócitos T e B e macrófagos.<sup>1,2</sup> Nas fases iniciais da doença e nos episódios de re-agudização, os neutrófilos são as células que predominam e desempenham um papel importante na destruição articular.<sup>1,2</sup> Nas fases crônicas, as células mononucleares constituem o infiltrado inflamatório e são responsáveis pelo dano articular.<sup>1,2</sup> Os sinoviócitos também desempenham um papel essencial na destruição tecidual pelo fato de produzirem metaloproteases quando ativados pelas citocinas secretadas pelos macrófagos.<sup>1,2</sup> Como a doença se inicia de forma insidiosa, o recrutamento de células para o sítio inflamatório processa-se de forma lenta. O consumo tecidual de neutrófilos, monócitos e também de linfócitos (de modo não tão acentuado) aumenta, fazendo com que a medula óssea aumente a produção celular. Como o estímulo para o aumento da produção medular é lento, ocorre um equilíbrio entre a produção e o consumo, apesar de a produção e o consumo tecidual estarem aumentados.<sup>1,2</sup> O resultado é que as alterações no leucograma não são significativas, o número de leucócitos pode ficar dentro dos valores de referência, com discretas neutrofilia e monocitose e, eventualmente, pode haver desvio nuclear à esquerda discreto. A monocitose pode ser um achado persistente na fase crônica. A AR pode ter um início de forma aguda (ocorre em 10% dos pacientes) e, durante a fase crônica da doença, pode haver períodos de agudização. Nessas situações, ocorre um desequilíbrio entre a produção e o consumo, e alterações leucocitárias, como leucocitose, neutrofilia com desvio nuclear à esquerda



e presença ou não de monocitose, podem ser vistas.<sup>1,2</sup> Um achado hematológico consistente é o de uma anemia normocítica e normocrômica caracterizando um quadro hematológico de anemia de doença crônica. A VHS está aumentada, e é um achado constante na artrite reumatoide.<sup>1,2</sup>

### DISENTERIA AMEBIANA

Disenteria é o nome dado a várias afecções caracterizadas pela inflamação do colo do intestino e que se manifestam por cólicas, tenesmo (sensação dolorosa na bexiga ou na região anal, com desejo contínuo de urinar ou evacuar) e evacuações com sangue e muco.<sup>1,2</sup> A disenteria amebiana é uma infecção intestinal causada pela *Entamoeba histolytica*. Aproximadamente 90% das infecções são assintomáticas; o restante apresenta um quadro clínico que varia de disenteria até abscesso hepático e de outros órgãos.<sup>1,2</sup> Esse protozoário é adquirido por meio da ingestão de cistos presentes na água, nos alimentos ou em mãos contaminadas e descrito como a terceira causa de morte entre as doenças parasitárias; as duas primeiras são a esquistossomose e a malária.<sup>1,2</sup> As áreas de maior incidência incluem locais como México, Índia, América Central, América do Sul, Ásia tropical e África.<sup>1,2</sup>

A infecção desenvolve-se entre 2 a 6 semanas após a ingestão dos cistos; a dor abdominal e a diarreia aumentam gradualmente de intensidade e são seguidas de mal-estar, perda de peso, dor abdominal difusa e dor nas costas.<sup>1,2</sup> Os episódios de diarreia tornam-se mais frequentes, com pouco material fecal e com presença de sangue e muco.<sup>1,2</sup> Pode ocorrer um quadro de infecção extraintestinal, que geralmente envolve o tecido hepático, causando um abscesso hepático amebiano.<sup>1,2</sup>

O leucograma caracteriza-se por leucocitose com neutrofilia, desvio nuclear à esquerda e sem eosinofilia; a pesquisa de leucócitos fecais é positiva.<sup>1,2</sup>

### DISENTERIA BACILAR

A disenteria bacilar é um processo infeccioso agudo do trato intestinal causado pelas bactérias do gênero *Shigella*, que são bactérias gram-negativas da família *Enterobacteriaceae*. Cerca de 140 milhões de casos de shigelose são registrados anualmente em todo o mundo, com cerca de 600 mil óbitos em crianças com idade inferior a 5 anos.<sup>1,2</sup> A transmissão ocorre por via oral, e a bactéria não tem dificuldade para passar pelo trato gástrico porque sobrevive bem em pH baixo.<sup>1,2</sup> As

manifestações clínicas incluem febre, diarreia líquida, que evolui para o quadro de disenteria (diarreia com sangue e muco), dor abdominal, vômitos, febre, urina escura (hemólise intravascular = hemoglobinúria), icterícia, equimoses, petéquias e desidratação.<sup>1,2</sup>

O leucograma apresenta leucocitose, podendo, no início da doença, apresentar leucopenia. A contagem de leucócitos situa-se em torno de 13.000 leucócitos/ $\mu$ L à custa de neutrofilia com desvio nuclear à esquerda, podendo apresentar granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacúolos no citoplasma dos neutrófilos; a pesquisa de leucócitos fecais é positiva.<sup>1,2</sup> Pode ocorrer um quadro de reação leucemoide.<sup>1,2</sup> A trombocitopenia com presença de esquizócitos chama a atenção para a possibilidade da ocorrência da síndrome hemolítico-urêmica, caracterizada por anemia hemolítica intravascular aguda e falência renal.<sup>1,2</sup> Essa síndrome pode ser desencadeada porque a toxina bacteriana tem uma ação direta sobre as células renais.<sup>1,2</sup> Hemoglobinúria, hematúria, hemossiderinúria, proteinúria, leucocitúria e cilindrúria são achados no parcial de urina.<sup>1,2</sup>

### ENDOCARDITE

A endocardite é definida como proliferação de microrganismos no endotélio cardíaco que causam um processo infeccioso envolvendo, principalmente, as válvulas cardíacas.<sup>1,2</sup> A endocardite pode ser classificada em aguda e subaguda. A primeira cursa com febre e é de instalação rápida; a forma subaguda se apresenta de modo insidioso com lesões cardíacas de evolução lenta.<sup>1,2</sup> A porta de entrada para os patógenos são a cavidade oral, a pele, o trato respiratório superior e, entre os usuários de drogas, a via endovenosa. Os microrganismos que podem causar endocardite infecciosa são estreptococos, pneumococos, enterococos, estafilococos, cocobacilos gram-negativos (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* e *Kingella*), bacilos gram-negativos e *Candida spp.*<sup>1,2</sup>

O achado laboratorial é de leucocitose à custa de neutrofilia e monocitose<sup>8</sup> (encontrada em aproximadamente 15-20% dos pacientes) com aumento da VHS.<sup>1,2</sup>

### GASTRENTERITE POR SALMONELA

A salmonela é uma bactéria gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, constitui um gênero com cerca de 2.300 sorotipos, está altamente adaptada ao crescimento no gênero humano e cerca de 200



sorotipos são patogênicos ao homem causando gastroenterite, que pode estar associada com infecções localizadas e bacteriemia.<sup>1,2</sup> A salmonelose ou febre entérica ou febre tifoide (uma doença sistêmica) é causada pela *S. typhi* ou *S. paratyphi*.<sup>1,2</sup>

A transmissão ocorre pela água ou por alimentos contaminados. Na febre entérica, a bactéria atravessa o trato gastrointestinal, coloniza o intestino delgado e, ao ser fagocitada pelos macrófagos, dissemina-se via sistema mononuclear fagocitário, rompendo a barreira intestinal, e coloniza o baço, o fígado, os linfonodos e a medula óssea.<sup>1,2</sup> No caso da salmonelose não tifoide, a bactéria causa uma infecção localizada com fluxo leucocitário bastante intenso, ocasionando uma gastroenterite autolimitada.<sup>1,2</sup>

A doença foi chamada inicialmente de febre tifoide devido às suas semelhanças clínicas com o tifo. Em 1800, a febre tifoide foi descrita como uma patologia definida, baseada em sua associação com o aumento das placas de Peyer e dos linfonodos mesentéricos. Em 1869, devido ao local do sítio infeccioso, o termo febre entérica foi proposto com o objetivo de distinguir da febre tifoide (tifo). Atualmente, as duas designações são usadas (febre tifoide e febre entérica).<sup>1,2</sup>

O período de incubação varia de 3 a 21 dias. Essa variabilidade está relacionada com a condição de saúde do paciente, com a capacidade de seu sistema imunológico e com o tamanho do inóculo. Os sintomas clínicos da infecção são febre prolongada (38,8-40,5 °C), calafrios, anorexia, hepatoesplenomegalia, epistaxes, dor de cabeça, fraqueza, dor de garganta, tosse, tontura e dores musculares.<sup>1,2</sup> Os sintomas gastrointestinais são variáveis, podendo apresentar tanto diarreia quanto constipação. Complicações tardias podem ocorrer após a 3ª ou 4ª semana da infecção, sendo mais comuns em adultos não tratados, e incluem perfuração e hemorragia gastrointestinal.<sup>1,2</sup> Cerca de 1 a 5% dos pacientes tornam-se portadores assintomáticos e passam a transmitir a bactéria via urinária e fecal.

O diagnóstico é feito pela coprocultura positiva para *S. typhi* ou *S. paratyphi*. A hemocultura tem uma positividade de 90% na primeira semana da infecção e diminui para 50% na terceira semana. Após a primeira semana, o hemograma apresenta leucopenia, neutropenia e desvio nuclear à esquerda.<sup>1,2</sup> A leucopenia e a neutropenia são consequências da ação da toxina bacteriana sobre a hematopoiese e não estão correlacionadas com a

gravidade da doença ou com exaustão da medula óssea. A partir da terceira semana, o aparecimento de leucocitose com neutrofilia sugere complicações supurativas.<sup>1,2</sup>

## ■ INFECÇÃO PULMONAR

A pneumonia é uma infecção do parênquima pulmonar que pode ser causada por várias espécies de bactérias, micoplasmas, clamídias, riquetsias, vírus, fungos e parasitas. O trato respiratório baixo normalmente é estéril, apesar da proximidade com microrganismos residentes na orofaringe e de estar exposto a microrganismos inalados pelo ar.<sup>1,2</sup>

A pneumonia caracteriza-se por ser de início agudo, com febre, tosse produtiva e purulenta e dor no peito. O patógeno mais comum é o *S. pneumoniae*, podendo ser causada por *S. aureus* e estreptococos. O leucograma frente a esses patógenos apresenta leucocitose à custa de neutrofilia e com desvio à esquerda.<sup>1,2</sup>

A pneumonia também pode ser causada por bacilos gram-negativos. Os mais comuns são *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp*, *S. marcescens* e *Acinetobacter*.<sup>1,2</sup> Os bacilos gram-negativos raramente causam infecções pulmonares em pacientes adultos previamente saudáveis. A pneumonia por esses patógenos é comum na infância, em idosos e em pessoas imunodeprimidas, especialmente nas que apresentam leucopenia com neutropenia.<sup>1,2</sup>

## ■ INFECÇÃO URINÁRIA

As infecções agudas do trato urinário são representadas pela uretrite, cistite (infecções do trato urinário baixo) e pela pielonefrite (infecção do trato urinário superior). Essas infecções podem se dar de modo conjunto ou podem ser independentes, e o paciente pode ser assintomático ou apresentar manifestações clínicas.<sup>1,2</sup> A infecção urinária ocorre em aproximadamente 1 a 3% das meninas em idade escolar; essa incidência aumenta muito com o início da atividade sexual. A maioria das infecções urinárias agudas e sintomáticas ocorre em mulheres adultas jovens, com uma incidência em torno de 0,5 a 0,7 infecções por ano por paciente; a infecção urinária sintomática não é comum em homens com idade inferior a 50 anos.<sup>1,2</sup>

Vários microrganismos podem infectar o trato urinário. Os mais comuns são os bacilos gram-negativos, sendo que a *E. coli* é responsável por 80% das infecções. *Proteus*, *Klebsiella* e ocasionalmente



*Enterobacter* podem causar infecções urinárias. Bactérias como *Serratia* e *Pseudomonas* ocorre com frequência em infecções urinárias de recorrência, principalmente em pacientes manipulados (sonda, cateter), com cálculo e obstrução renal.

Cocos gram-positivos, como *Staphylococcus saprophyticus*, respondem por 10 a 15% das infecções urinárias, que, ocasionalmente, também podem ser causadas pelo enterococo.<sup>1,2</sup>

Nas infecções urinárias sintomáticas, o leucograma pode apresentar leucocitose à custa de neutrofilia e desvio nuclear à esquerda, podendo apresentar granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle.

## LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma zoonose que tem como hospedeiros diversos animais selvagens ou domésticos e pode variar de uma doença inaparente até uma infecção fulminante e fatal.<sup>1,2</sup> As infecções no homem ocorrem por contato direto com urina (a urina do rato é a fonte mais comum de infecção) ou tecidos de animais infectados ou, indiretamente, por contato com água ou solo contaminados. As portas de entrada habituais no homem são a pele com solução de continuidade, ou as mucosas, como a conjuntiva, a nasal e a oral.<sup>1,2</sup> O período de incubação varia entre 2 a 20 dias. A doença inicia de forma aguda (fase leptospirêmica), com o paciente apresentando dor de cabeça, dores musculares intensas, calafrios e febre (pode chegar a 39 °C). Essa fase tem uma duração entre 4 a 9 dias.<sup>1,2</sup> Esse período tem como característica principal febre e conjuntiva lacrimejante, pode ocorrer rash cutâneo e icterícia moderada; a maioria dos pacientes torna-se assintomática dentro de uma semana.<sup>1,2</sup> A segunda fase da doença é chamada de imune e tem como característica a produção de anticorpos. A febre e as mialgias tornam-se menos graves, 15% dos pacientes podem apresentar meningite asséptica (líquido cefalorraquiano [LCS] com contagem leucocitária entre 10-1.000 leucócitos/ $\mu$ L, com predomínio de células mononucleares); os sintomas da meningite podem desaparecer em poucos dias ou permanecer por algumas semanas.<sup>1,2</sup>

A doença pode se manifestar como um quadro clínico bastante grave, conhecido como síndrome de Weil, causado pela *Leptospira icterohaemorrhagiae*, que se caracteriza por icterícia, disfunção renal, hemorragia, anemia hemolítica e alto índice de mortalidade.<sup>1,2</sup> O início da doença é

semelhante às formas menos graves, mas as alterações renais e hepáticas manifestam-se ao redor do 3º ao 6º dia.<sup>1,2</sup> A hemólise intravascular pode ser a causa de anemia intensa e aumento da bilirrubina sérica, geralmente menor que 20 mg/dL, mas podendo atingir valores de 40 mg/dL na infecção grave; a ureia, a fosfatase alcalina e as transaminases estão aumentadas, indicando comprometimento hepático e renal.<sup>1,2</sup>

O leucograma pode apresentar número de leucócitos normal ou elevado, podendo chegar a 50.000 leucócitos/ $\mu$ L em pacientes ictericos graves.<sup>1,2</sup> Leucocitose acima que 15.000, à custa de neutrofilia e desvio nuclear à esquerda, sugere envolvimento hepático.<sup>1,2</sup> A trombocitopenia é um achado frequente na síndrome de Weil, e são encontradas manifestações hemorrágicas, como epistaxes, petéquias e equimoses.<sup>1,2</sup>

## LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória considerada como protótipo de doença autoimune; a prevalência na população é de um caso para cada 2 mil a 10 mil habitantes, 90% dos casos ocorrem em mulheres, incidindo principalmente na faixa etária entre 15 e 40 anos, com média de idade de 30 anos, na ocasião do diagnóstico.<sup>1,2</sup>

Os achados clínicos variam de acordo com a fase da doença e distribuição das lesões. O LES pode iniciar abruptamente com febre, simulando uma infecção aguda, ou pode desenvolver-se de forma insidiosa durante meses ou anos somente com episódios de febre e mal-estar; podem aparecer manifestações em qualquer órgão.<sup>1,2</sup> Sinais e sintomas gerais como febre, perda de peso e fadiga ocorrem em 60 a 80% dos casos na fase ativa da doença, e alterações dermatológicas ocorrem em 80% dos pacientes durante a evolução da doença.<sup>1,2</sup> O eritema malar, característico em forma de “borboleta”, é uma das várias lesões cutâneas que podem ocorrer. A artralgia é referida em 90% dos pacientes, e o comprometimento articular geralmente é intermitente e não deixa sequelas. O comprometimento renal é observado em 50% dos casos, podendo-se manifestar por grau variável de edema, hipertensão arterial e oligúria.<sup>1,2</sup>

O comprometimento hematológico ocorre em mais de 50% dos pacientes, manifestando-se por anemia de doença crônica, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia; ocasionalmente, podem ocorrer anemia hemolítica e trombocitopenia grave.<sup>1,2</sup>



As provas de atividade inflamatória, como a velocidade de hemossedimentação e a dosagem da  $\alpha_1$  glicoproteína ácida, estão elevadas na fase aguda e tendem a normalizar com a melhora do quadro clínico. A VHS pode apresentar valores acima de 100 mm por hora.<sup>1,2</sup> As células LE estão presentes em 80% dos pacientes com doença em atividade e em 65% dos pacientes em remissão. Embora não seja específico, o encontro de célula LE em alta porcentagem é sugestivo de lúpus eritematoso sistêmico.<sup>1,2</sup> Os testes mais específicos para o diagnóstico do lúpus eritematoso são as pesquisas de anticorpos antinucleares e anticitoplasmáticos. A pesquisa de anticorpo anticardiolipina torna-se obrigatória na suspeita de síndrome do anticorpo antifosfolípido secundário ao LES.<sup>1,2</sup> A presença de crioglobulinas pode ocorrer em 11% dos pacientes, com frequência associada à doença em atividade.<sup>1,2</sup> A **Figura 9.8** mostra fotos de células LE e massas amorfas.

## ■ MALÁRIA

A malária é causada por um hematozoário intracelular do gênero *Plasmodium* e transmitida por vetores, que são os mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo uma infecção por protozoários que evolui em surtos com manifestações clínicas agudas.<sup>1,2</sup> Existem quatro espécies de plasmódios que parasitam exclusivamente o homem: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie* e *P. ovale*. As três primeiras espécies ocorrem no Brasil, com predomínio das infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, que respondem aproximadamente por 98% dos casos notificados.<sup>1,2</sup>

A pesquisa de parasitas da malária é realizada em extensões sanguíneas ou em gotas espessas coradas com corantes hematológicos. Preferencialmente,

a coleta de sangue deve ser feita durante a fase de calafrios, ou pouco depois do paroxismo febril, para ter uma probabilidade maior de êxito, principalmente nas infecções por *P. falciparum*, em que os parasitas permanecem no sangue circulante apenas durante algumas horas.<sup>1,2</sup> Na malária por *P. falciparum*, o aspecto microscópico evidencia apenas as formas de trofozoítas jovens, uma vez que as formas maduras ficam retidas na circulação esplênica, e os gametócitos (classicamente descritos como em forma de bananas) aparecem apenas após sete dias da instalação do quadro clínico.<sup>1,2</sup> Na malária causada pelo *P. vivax*, o panorama microscópico é diferente: são visualizados todos os estágios de maturação das formas assexuadas do parasita, além dos gametócitos que estão presentes no sangue já no início do quadro.<sup>1,2</sup>

Os gametócitos, por serem as formas evolutivas morfológicamente mais distintas entre as diversas espécies de plasmódios, são fundamentais para o reconhecimento microscópico da espécie de plasmódio.<sup>1,2</sup>

O eritograma é variável, podendo apresentar uma anemia que varia de discreta a moderada, normocítica e normocrômica e com sinais discretos de hemólise, até uma anemia intensa com hemólise intravascular franca com policromatofilia e reticulocitose. O leucograma pode apresentar leucocitose à custa de neutrofilia e sem DNE.

A icterícia na malária é um sinal de alerta para complicações. Ocorre geralmente na segunda semana e não se relaciona com a presença de doença hepática prévia. Quase sempre se instala de maneira brusca, com elevados níveis de bilirrubinas e moderado aumento das transaminases séricas, fosfatase alcalina e  $\gamma$ -glutamil-transpeptidase.<sup>1,2</sup>



**FIGURA 9.8** Células LE e massas amorfas.



Essas alterações provavelmente refletem colestase intra-hepática, por alterações funcionais do hepatócito e hemólise intravascular. A insuficiência renal é a complicação mais frequente e a principal causa de morte. A oligúria na malária por *P. falciparum*, na maioria das vezes, indica apenas desidratação, que deve ser valorizada e imediatamente tratada, pois pode levar à insuficiência renal aguda, facilitada pela hemólise intravascular e pela deposição de imunocomplexos nos rins.<sup>1,2</sup> Os doentes evoluem com oligúria e anúria e apresentam taxas elevadas de ureia e de creatinina sérica.<sup>1,2</sup>

A febre hemoglobinúrica, também conhecida como *blackwater fever* ou “febre da água preta”, é uma forma especial de apresentação da insuficiência renal aguda na malária. É atribuída à hemólise intravascular maciça, decorrente, principalmente, de hipersensibilidade a antipalúdicos do grupo das 8-aminoquinoleínas e, mais raramente, à quinina ou mesmo às sulfas e está relacionada com a deficiência congênita da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).<sup>1,2</sup>

A coagulação intravascular disseminada (CIVD) e a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) são complicações da malária com alta letalidade.<sup>1,2</sup> Na malária, a hemossedimentação costuma ser elevada, em geral, acima de 40 mm na primeira hora.<sup>1,2</sup>

## ■ MENINGITE

A meningite bacteriana é uma infecção purulenta que ocorre no espaço subaracnoide com envolvimento das meninges e do parênquima cerebral.<sup>1,2</sup> Os patógenos mais comuns na meningite bacteriana são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, estreptococo do grupo B, *Listeria monocytogenes* e o *Haemophilus influenza*.

Em adultos acima de 20 anos, o *Streptococcus pneumoniae* é o agente etiológico mais comum, e o principal fator de risco é a pneumonia pneumocócica; outros fatores de risco são otite média aguda ou crônica, alcoolismo, diabetes, esplenectomia, hipogamaglobulinemia, deficiência de complemento e traumatismo craniano.<sup>1,2</sup> Em crianças e adultos jovens, com faixa etária entre 2 a 20 anos, 60% dos casos de meningite bacteriana são causados pela *Neisseria meningitidis*.<sup>1,2</sup>

Tanto o *Streptococcus pneumoniae* como a *Neisseria meningitidis* colonizam a nasofaringe ao se aderirem às células epiteliais nasofaríngeas, posteriormente, invadem o espaço intravascular e

podem ter acesso à corrente circulatória. Pelo fato de serem capsuladas, conseguem evitar a ação do sistema complemento. Podem infectar as células epiteliais do plexo coroide e, posteriormente, ter acesso ao LCS.<sup>1,2</sup> Uma vez no LCS, a bactéria tem condições de proliferar porque o fluido contém poucos leucócitos e imunoglobulinas.<sup>1,2</sup> A meningite pode-se apresentar como uma infecção de instalação aguda (algumas horas) ou como uma infecção subaguda, que piora progressivamente em alguns dias. Os sintomas clínicos clássicos da meningite são febre, dor de cabeça e rigidez da nuca (esses sintomas ocorrem em 90% dos casos), vômitos, náuseas e fotofobia.<sup>1,2</sup>

O LCS normal não contém polimorfonucleares; sua celularidade é composta de células mononucleares (linfócitos e monócitos). Na meningite bacteriana, o LCS apresenta mais de 100 polimorfonucleares/ $\mu\text{L}$ .<sup>1,2</sup>

O leucograma apresenta leucocitose (cerca de 14.000-24.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$ ) à custa de neutrofilia, podendo apresentar DNE intenso e precursores mielóides, com presença de granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle. A leucocitose e a neutrofilia geralmente são mais acentuadas nas meningites por estreptococos e meningococos.<sup>1,2</sup>

## ■ SEPTICEMIA

Septicemia é uma resposta sistêmica a uma invasão microbiana ao sangue periférico que também pode ser definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica a um microrganismo.<sup>1,2</sup> A presença do microrganismo não é essencial para o desenvolvimento do quadro séptico, pois moléculas ou toxinas microbianas podem desencadear um quadro de septicemia.<sup>1,2</sup> A septicemia pode ser causada tanto por bactérias gram-negativas (BGN) quanto positivas (BGP); 35% das septicemias são causadas por BGN (enterobactérias, pseudomonas e *Haemophilus spp*) e 40% são causadas por BGP (*Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase negativa, enterococos e *Streptococcus pneumoniae*). O restante, por fungos, infecções mistas, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pyogenes*.<sup>1,2</sup>

Os fatores predisponentes para a septicemia por BGN são diabetes melito, doenças linfoproliferativas, cirrose hepática, queimaduras, procedimentos invasivos e estados de neutropenia. As principais causas de septicemia por BGP são o uso de cateteres, queimaduras e drogas endovenosas. A septicemia por fungos está associada a pacientes



imunodeprimidos e com neutropenia.<sup>1,2</sup> A septicemia pode se originar de infecções localizadas ou ser introduzida via manipulação.<sup>1,2</sup>

O sistema de defesa inato do organismo humano é capaz de reconhecer endotoxinas bacterianas; a mais potente e mais bem estudada das endotoxinas bacterianas é o LPS (lipolissacarídeo). A presença dessa toxina é o sinal ao organismo humano da presença bacteriana na corrente circulatória. O plasma humano contém uma proteína que se une a LPS, chamada de LBP (*LPS binding protein*). A ligação da LBP ao LPS faz com que esse complexo seja reconhecido e fixado na membrana citoplasmática de neutrófilos, monócitos e macrófagos, via CD14 expresso na membrana citoplasmática dessas células.<sup>1,2</sup> Essa ligação torna as células ativadas, com consequente liberação de citocinas, que irão ampliar e diversificar a resposta inflamatória.<sup>1,2</sup> Outros polissacarídeos bacterianos, como os peptidoglicanos, enzimas extracelulares e toxinas, suscitam a mesma resposta inflamatória, e muitas dessas moléculas também se unem ao CD14.<sup>1,2</sup> Outros mecanismos inatos de defesa, como o sistema complemento e proteínas que se ligam à manose, são capazes de reconhecer moléculas bacterianas.<sup>1,2</sup>

Entre as citocinas liberadas, uma que tem um papel bastante importante na septicemia é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que estimula leucócitos e células endoteliais do epitélio vascular a produzirem mais citocinas, inclusive maior quantidade de TNF- $\alpha$ . As células endoteliais ativadas, além de produzirem mais citocinas, secretam moléculas pró-coagulantes, PAF (fator ativador de plaquetas) e outros mediadores. Nesse ponto, fecha-se um ciclo de ativação, os leucócitos e as células endoteliais estão ativados e um ativa o outro; a concentração de citocinas no sangue periférico aumenta consideravelmente.<sup>1,2</sup> As plaquetas tornam-se ativadas e, a partir de sua membrana citoplasmática, liberam fosfolipídeos como o ácido aracdônico, que pode ser convertido pela via das cicloxigenases em prostaglandina E2 e tromboxane. A prostaglandina E2 causa vasodilatação periférica, e o tromboxane é vasoconstritor e promove a agregação plaquetária. O PAF ativa neutrófilos e estimula a degranulação, além de promover a agregação plaquetária. A deposição de fibrina intravascular, a formação de trombos e a coagulação intravascular são respostas ao quadro inflamatório da septicemia a partir da ativação da cascata da coagulação sanguínea. A deposição sistêmica de fibrina e formação de microcoágulos levam

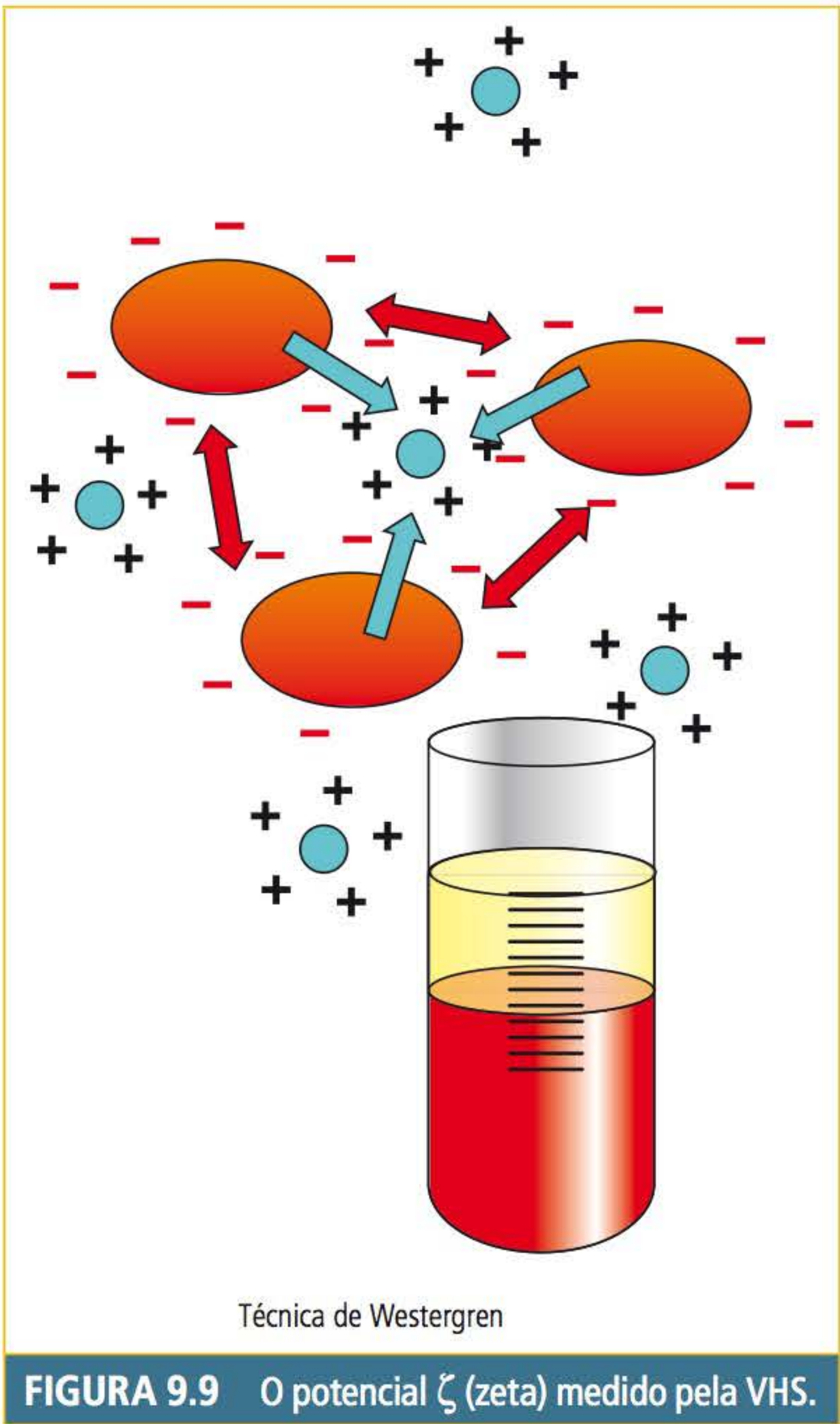
ao consumo dos fatores de coagulação e das plaquetas, o que predispõe o paciente a sangramentos. O sistema complemento também torna-se ativado, o C5a e outros produtos da ativação do complemento promovem a ativação dos neutrófilos. O TNF- $\alpha$ , como efeito local, ativa o endotélio e aumenta a permeabilidade vascular; com isso, aumenta a entrada tecidual de imunoglobulinas e anticorpos. Como efeito sistêmico, causa febre, aumenta a migração leucocitária e desencadeia o choque séptico. O último é devido a uma vasodilatação sistêmica com extravasamento maciço de plasma aos tecidos e diminuição da volemia com consequente insuficiência renal, cardíaca, hepática e pulmonar.

O hemograma apresenta leucocitose à custa de neutrofilia, com desvio nuclear à esquerda, podendo apresentar precursores mielóides, trombocitopenia, granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacúolos nos neutrófilos. Ocorre aumento do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), diminuição da concentração de fibrinogênio, presença de produtos de degradação do fibrinogênio e/ou fibrina (PDF) e aumento na concentração de D-dímero. Um quadro de leucopenia com neutropenia, desvio nuclear à esquerda e até células mais jovens como mielócitos e metamielócitos, com presença de granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacúolos nos neutrófilos, é sugestivo de exaustão de medula óssea.<sup>1,2</sup>

### VELOCIDADE DE HEMOSSEDIMENTAÇÃO

A velocidade de hemossedimentação (VHS) é a distância medida em milímetros que os eritrócitos percorrem em um tubo vertical durante um determinado período de tempo.<sup>9</sup> A membrana citoplasmática eritrocitária tem carga negativa devido à presença de ácido siálico, carga negativa que cria um potencial de repulsão entre os eritrócitos, chamado de potencial  $\zeta$  (zeta),<sup>1,2</sup> conforme se observa na **Figura 9.9**. Esse potencial de repulsão impede que os eritrócitos se empilhem (*roleaux*) e sedimentem rapidamente; por isso os valores de referência da VHS, para pessoas normais, são baixos na primeira hora de sedimentação.<sup>1,2</sup> Quando ocorrem alterações nas concentrações plasmáticas de moléculas, como fibrinogênio e imunoglobulinas, o potencial  $\zeta$  é vencido, o empilhamento é formado, e a velocidade de sedimentação aumenta, fornecendo um valor mais elevado que o da referência na primeira hora.<sup>1,2</sup>





A técnica manual da VHS é feita na pipeta de Westergren, um tubo de vidro ou plástico com 30 cm de comprimento, 2,5 mm de largura e aferido em uma escala de 0 (início da escala) a 200 (final da escala) milímetros.<sup>9</sup> Na técnica original de Westergren, o sangue venoso é coletado com citrato de sódio a 0,106M na proporção de 1 parte de anticoagulante para 4 partes de sangue. Após a homogeneização durante cinco minutos, a pipeta de Westergren é preenchida, colocada na estante de Westergren e, após 60 minutos, a leitura é realizada, e o resultado é expresso em milímetros.<sup>8,10,11</sup> No método de Westergren modificado, o sangue venoso é coletado com EDTA (obedecendo à proporção sangue:anticoagulante). Após homogeneização durante cinco minutos, 1,6 mL do sangue são diluídos em 0,4 mL de soro fisiológico ou citrato de sódio 0,106M.<sup>10</sup> A mistura é homogeneizada durante cinco minutos, e a pipeta de Westergren é preenchida e colocada na estante. Após 60 minutos, o grau de sedimentação é medido na escala milimetrada.<sup>8</sup> A VHS também pode ser feita

por automação (sistema Ves-Matic), sendo o resultado obtido em 20 minutos, pois a sedimentação é acelerada pela inclinação de 18°.<sup>8</sup> A automação é preferível ao método manual porque elimina interferentes grosseiros, é mais rápida, e a quantidade de sangue varia entre 30 a 150 µL. Os valores de referência deveriam ser estabelecidos para cada laboratório,<sup>10,11</sup> mas, de modo geral, os valores utilizados como referência estão mostrados na **Tabela 9.1**.

TABELA 9.1 Valores de referência para a VHS		
Homens	Abaixo de 50 anos	0 a 15 mm
	Acima de 50 anos	0 a 20 mm
Mulheres	Abaixo de 50 anos	0 a 20 mm
	Acima de 50 anos	0 a 30 mm
Crianças		0 a 10 mm

Tecnicamente, a VHS manual é um exame grosseiro, porque tem muitos interferentes. Se o ângulo formado entre a pipeta de Westergren e o plano da estante estiver acima de 3°, o resultado da VHS é afetado,<sup>1,2</sup> temperaturas abaixo de 15° ou acima de 30° interferem no resultado,<sup>1,2,9,11</sup> também interferem no resultado da VHS a incidência de luz solar direta,<sup>1,2,9</sup> estante colocada na mesma bancada em que está alguma centrífuga<sup>1,2,9,11</sup> e mudança de local da estante quando a VHS está sendo processada.<sup>1,2</sup>

Os eritrócitos sedimentam mais rapidamente quando há um aumento na concentração plasmática de fibrinogênio, imunoglobulinas ou outras proteínas de fase aguda devido à alteração da viscosidade plasmática.<sup>3</sup> Alterações na morfologia ou contagem eritrocitária afetam o resultado da VHS na anemia falciforme; apesar de a anemia ser moderada ou intensa, a VHS está dentro dos valores de referência, podendo até não haver sedimentação dos eritrócitos. Isso ocorre pela intensa pecilocitose, que impede o empilhamento eritrocitário.<sup>3</sup> Na policitemia vera e nas eritrocitoses, a VHS tende a estar diminuída; nas anemias sem alteração de morfologia, está aumentada.<sup>3</sup> Variações fisiológicas, como gestação e ciclo menstrual, influenciam o resultado da VHS. Determinados medicamentos (contraceptivos orais, penicilina)<sup>12</sup> e tabagismo também podem interferir;<sup>10</sup> nem sempre está elevado em pessoas com alguma patologia e pode atingir valores entre 35 a 40 mm em idosos saudáveis.<sup>12</sup> Pessoas com doença hepática



ou carcinomas tendem a ter uma VHS diminuída pela incapacidade de produzir proteínas de fase aguda.<sup>3</sup> Pacientes com a VHS aumentada sem explicação devem ser pesquisados quanto a gamopatias monoclonais. A VHS está aumentada em doenças malignas, colagenoses, doença reumática e estados de doença crônica. Além disso, a VHS também é utilizada para monitorar a recidiva de linfomas Hodgkin e não Hodgkin.<sup>3</sup> Clinicamente, é útil para o monitoramento da progressão de doenças como artrite reumatoide ou tuberculose.<sup>9</sup> Entre as condições clínicas mais frequentemente associadas com aumento da VHS, destacam-se a hemodiluição (anemias agudas ou crônicas, sem alteração de morfologia), aumento de proteínas de fase aguda (doença reumática), a presença de proteínas plasmáticas anormais (mieloma múltiplo), o aumento da concentração de imunoglobulinas (processos infecciosos ou inflamatórios) e as neoplasias malignas.<sup>12</sup> Valores da VHS muito elevados (acima de 80 mm) raramente são o único indicador de neoplasias, inflamações ou infecções graves.<sup>12</sup> Já foi relatado, em comunicação pessoal, em apendicite crônica, o achado laboratorial de uma VHS de 100 mm com um hemograma normal. Muitos autores consideram que o aumento da VHS constitui-se no principal sinal biológico de inflamação, sendo empregado como um exame de *screening* e na documentação de processos inflamatórios.<sup>12</sup>

## REFERÊNCIAS

1. Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do leucograma. São Paulo: Robe; 2003.
2. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. Hematologia laboratorial. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.
3. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, et al. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
4. Contran RS, Kumar V, Robbins LS. Robbins: pathologic basis of disease. Philadelphia: W. B. Saunders; 1994.
5. Clarke G. Toward abandoning the band: a practice recommendation of the CCQLM. CCQML. 2006;(5):1-5.
6. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
7. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. Hematology basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
8. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology principles, procedures, correlations. 2nd ed. New York: Lippincott; 1998.
9. Lewis SM, Kumari S. Erythrocyte sedimentation rate (ESR). In: Lewis SM, Kumari S. Standard operating procedures for haematology. New Delhi: WHO; 2000.
10. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. J Clin Pathol. 1993;46(3):198-203.
11. National Committee for Clinical Laboratories Standards. Methods for the erythrocyte sedimentation rate (ESR) test. 3rd ed. Villanova: NCCSL; 1993.
12. Santos VM, Cunha SFC, Cunha DF. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidades e limitações. Rev Associação Med Bras. 2000;48(3):232-6.

## Leituras Recomendadas

- Ardor MJ, Westgard JC, Dutcher TF. Band neutrophils counts are unnecessary for the diagnosis of Infection in Patients with normal total leucocyte counts. Am J Clin Pathol. 1994;102(5):646-9.
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser S, Longo DL, Jameson JL. Harrison's: principles of Internal Medicine. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Cavaillon JM. The role of cytokines in allergic processes. Immuno-anal Biol Spec. 1994;9:15-22.
- Edling CE, Hallberg B. c-Kit-a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(11):1995-8.
- Gobber LM, Eckman JA, Sterba PM, Vasagar K, Schroeder JT, Golden DBK, et al. Expression of activation markers on basophils in a controlled model of anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 2007;119(5):1181-8.
- Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
- Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 5. ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.
- Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
- Kraft DL, Czechowicz A, Bhattacharya D, Weissman IL. Ability of anti c-kit targeting monoclonal antibody ACK-2 to target hematopoietic stem cell and facilitate engraftment of human CD34+ engraftment and hematolymphoid development in immunodeficient mice. Biol Blood Marrow Tr. 2007;13(2):72.
- Lichtmann MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
- Miale JB. Laboratory medicine: hematology. 6th ed. St. Louis: Mosby; 1982.
- Quindry JC, Stone WL, King J, Broeder CE. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. Med Sci Sports Exerc. 2003;35(7):1139-45.
- Silva PH, Hashimoto Y. Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária. Rio de Janeiro: Revinter; 2006.
- Simon D, Simon H. Eosinophilic disorders. J Allergy Clin Immunol. 2007;119(6):1291-300.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. J Allergy Clin Immunol. 2006;125(2):S73-80.
- Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cell and their niche. Trends Immunol. 2005;26(8):426-33.
- Vilela ALM. Sistema linfático [Internet]. [S.l.]: AFH; [20--?] [capturado em 20 abr 2015]. Disponível em: [www.afh.bio.br/immune/linfa1.asp](http://www.afh.bio.br/immune/linfa1.asp).



## SÉRIE BRANCA – LEUCOGRAMA

### PROCESSOS INFECCIOSOS VIRAIS E ANOMALIAS LEUCOCITÁRIAS

10 ■■

#### CAUSAS DE LINFOCITOSE E LINFOPENIA

A linfocitose é rara em infecções bacterianas agudas; a única exceção é a coqueluche, cujo patógeno é a *Bordetella pertussis*. Nessa doença, a leucocitose pode ser intensa (acima de 20.000 a 30.000 leucócitos/microlitro, podendo chegar a 100.000 ou mais) à custa de uma linfocitose que pode representar 80 a 90% do número de leucócitos.<sup>1,2</sup>

A linfocitose infecciosa aguda tem como agente etiológico o enterovírus *Coxsackie* do subgrupo A; é uma doença característica da infância (entre 1-10 anos), benigna e assintomática.<sup>3</sup> Caso a criança apresente algum sintoma, esse se manifesta como febre, infecção do trato respiratório, diarreia e dor abdominal.<sup>3</sup> O leucograma apresenta leucocitose (geralmente entre 40.000 a 50.000 leucócitos/microlitro) à custa de linfocitose sem a presença de linfócitos atípicos.<sup>3</sup> A doença cursa em um período de 3 a 5 semanas, podendo chegar até dois meses.<sup>3</sup> Outras causas de linfocitose são mononucleose infecciosa (MNI), hepatite viral, rubéola, brucelose, tuberculose, infecções por citomegalovírus e doenças hematopoiéticas, como leucemia linfocítica crônica e tricoleucemia.<sup>1,2</sup>

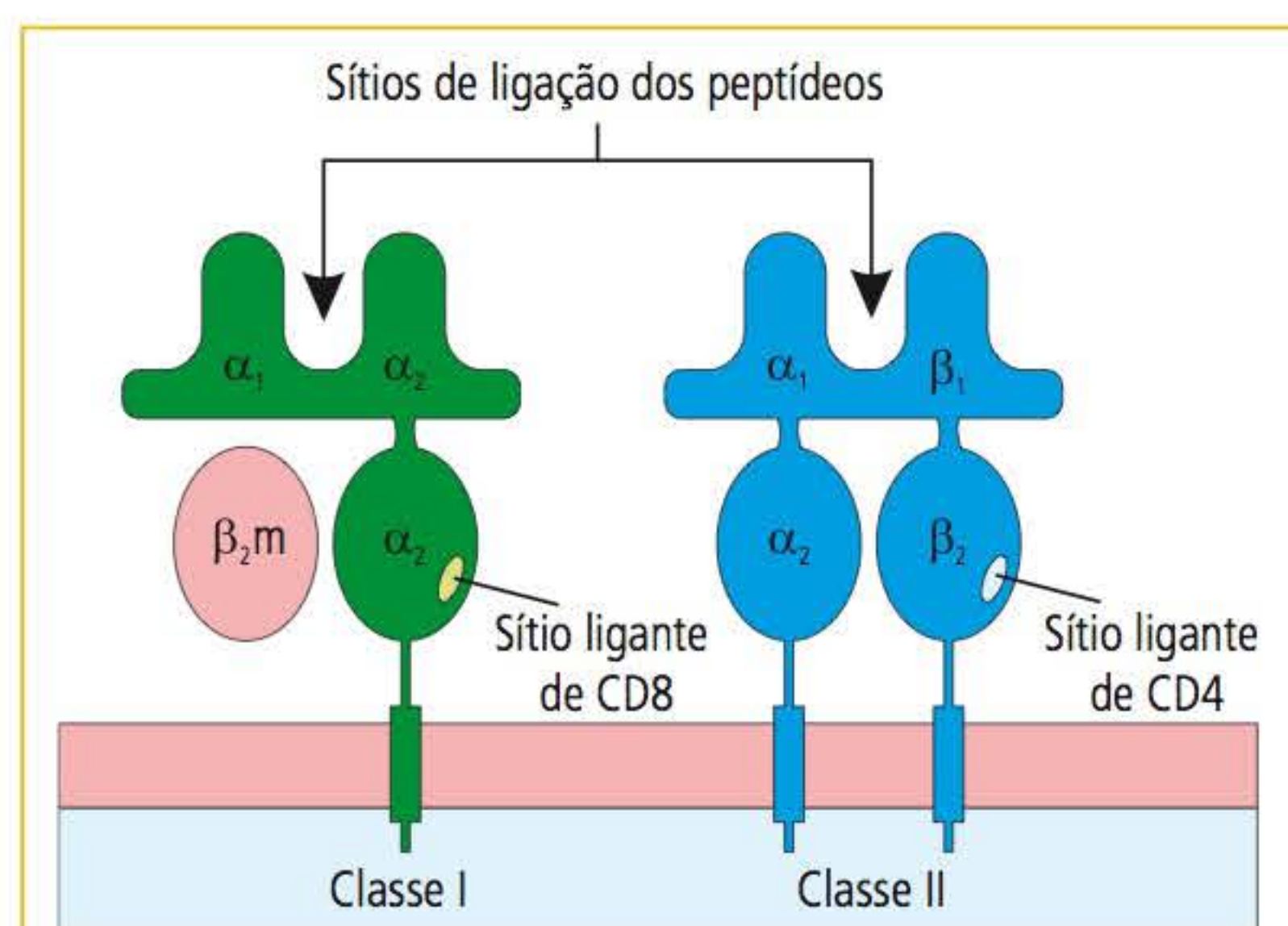
As principais causas de linfopenia são infecções agudas, tuberculose ativa, carcinomas, linfomas, lúpus eritematoso, agranulocitose, malária, síndromes de imunodeficiência, falência cardíaca, pancreatite, administração de esteroides e quimioterapia.<sup>1,2</sup>

#### FISIOPATOLOGIA DO PROCESSO INFECCIOSO VIRAL

Quando uma célula é infectada por um vírus, produz interferon  $\alpha$  e  $\beta$  com a finalidade de prevenir a replicação viral dentro da célula infectada e bloquear a disseminação do vírus a outras células. Tanto o interferon  $\alpha$  quanto o  $\beta$  ativam a defesa imune inata, que é representada pelos linfócitos NK que, quando ativados, secretam INF- $\gamma$ . Os linfócitos NK ativados migram do sangue para o tecido infectado e exercem a função citotóxica, representada por morte celular e secreção de citocinas. O INF- $\gamma$  ativa macrófagos e células dendríticas que secretam IL-12, que ativa as células NK; nesse ponto, fecha-se um ciclo de retroativação. Os macrófagos e as células dendríticas são células apresentadoras de antígenos, que, após a fagocitose, processam e apresentam peptídeos antigênicos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*). Peptídeos antigênicos ligados ao MHC II ativam os linfócitos T CD4+, os ligados ao MHC I ativam linfócitos CD8+,<sup>4</sup> conforme se observa na **Figura 10.1**. Os linfócitos CD4+ diferenciam-se em duas subpopulações: Th1 e Th2; as células Th1, pela produção de IL-2 e INF- $\gamma$ , também ativam as células CD8+, que se tornam citotóxicas efetoras.<sup>4</sup> As células Th1 também aumentam a atividade microbida do macrófago e, junto com as CD8+, atuam no sítio inflamatório. As células Th2 ativam os linfócitos B, nos órgãos linfoides secundários, a produzirem



anticorpos. O linfócito B também pode ser ativado diretamente pelo antígeno, que se liga aos receptores de célula B; o complexo antígeno-BCR é endocitado, processado e reapresentado na membrana citoplasmática do linfócito B em associação ao MHC II; essa expressão aumenta a ativação dos linfócitos T pela interação célula a célula (linfócito T-antígeno – MHC II-linfócito B).<sup>4</sup> Com a ativação dos linfócitos NK das células dendríticas e dos macrófagos, as imunidades celular e humoral estão ativadas de modo constante. Esse quadro de ativação do sistema imunológico será bloqueado pela ação dos linfócitos T supressores (CD8+). Como resultado dessa ativação, os plasmócitos formam as células B de memória, e os linfócitos T efetores CD8+, as células T de memória.



**FIGURA 10.1** Reconhecimento imune pelas células T.

## LEUCOGRAMA NOS PROCESSOS INFECCIOSOS VIRAIS

### ■ CITOMEGALOVÍRUS

O citomegalovírus (CMV) é um vírus herpes que acomete todas as faixas etárias e causa uma doença com expressão bastante variável desde assintomática, passando por infecções subclínicas, síndrome mononucleosa em pessoas saudáveis, até uma doença disseminada em pacientes imunodeprimidos.<sup>1,2</sup> O vírus está presente no leite materno, na saliva, nas fezes, na urina, no sêmen e na secreção cervical. A transmissão dá-se da mãe para o feto, pelo contato íntimo repetido e prolongado entre pessoas e pela via sexual.<sup>1,2</sup> A transfusão de sangue total ou hemocomponentes pode ser a via de transmissão do CMV se nesses hemoderivados houver a presença de leucócitos viáveis e infectados.<sup>1,2</sup>

Uma vez infectado, o indivíduo será portador do CMV durante toda sua vida. O vírus fica em forma latente, e as síndromes de reativação ocorrem quando há uma depressão do sistema imunológico, especificamente da imunidade celular.<sup>1,2</sup> Essa reativação é vista, particularmente, nos transplantes de órgãos, em neoplasias linfoides e nas síndromes de imunodeficiência adquirida, principalmente no HIV.<sup>1,2</sup>

A infecção pelo CMV pode ser congênita e ocorre em 5% dos fetos infectados. As manifestações clínicas incluem petéquias, hepatoesplenomegalia e icterícia presentes em 60 a 80 % dos casos, microcefalia, déficit de crescimento intrauterino e prematuridade (30-50% dos casos). Laboratorialmente, ocorre aumento das transaminases, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia, hemólise e aumento das proteínas do liquor.<sup>1,2</sup> A mortalidade está em torno de 20 a 30%. Nas infecções assintomáticas ao nascimento, que acometem cerca de 5 a 25% dos infectados, as crianças desenvolvem, nos anos seguintes, alterações psicomotoras, auditivas, oculares e anormalidades dentárias.<sup>1,2</sup> A infecção perinatal pode ser adquirida no parto, no momento da passagem do feto pelo canal vaginal infectado, do leite materno ou de outras secreções; a maioria dos recém-nascidos infectados por essa via permanece assintomática.<sup>1,2</sup> Dificuldade em ganhar peso, adenopatia, hepatite, anemia e linfocitose com linfócitos atípicos podem ser consequência da infecção pelo CMV.

A síndrome mononucleosa é uma manifestação clínica comum do CMV em pessoas saudáveis; ocorre em qualquer idade e é mais comum em adultos jovens sexualmente saudáveis.<sup>1,2</sup> Os sinais clínicos dessa síndrome são febre alta e prolongada, algumas vezes acompanhada de calafrios, fadiga, mal-estar, mialgias, dor de cabeça e esplenomegalia. Ao contrário da mononucleose infecciosa, linfadenopatia, icterícia e faringite são raras. O sangue periférico apresenta-se com leucocitose à custa de linfocitose, com mais de 10% de linfócitos atípicos. A maioria dos pacientes recupera-se do quadro infeccioso sem sequelas, mas a excreção do vírus pela urina, pelo trato genital e pela saliva continua por meses ou anos.<sup>1,2</sup>

A infecção pelo CMV é comum e importante nos transplantes de órgãos, em receptores de rim, coração, pulmão e fígado. O CMV induz a uma série de síndromes, febre e leucopenia, hepatite, pneumonia, esofagite, gastrite, colite e retinite. A



infecção pelo CMV é um importante fator de risco tanto para a perda do órgão transplantado quanto para o óbito do paciente. O período máximo de risco está entre o primeiro e o quarto mês pós-transplante.

O CMV é um importante patógeno para pessoas com HIV, principalmente quando a contagem de linfócitos CD4+ está abaixo 50 ou 100 linfócitos CD4 +/- µL.

Nos pacientes imunodeprimidos, os sinais clínicos são febre prolongada, mal-estar, fadiga, anorexia, suores noturnos, artralgias ou mialgias e comprometimento hepático. Há uma associação entre infecção pelo CMV e desenvolvimento de anticorpos frios (crioaglutininas).

Os principais achados do leucograma durante o curso da infecção pelo CMV são leucocitose à custa de linfocitose (geralmente acima de 4.500 linfócitos/µL) com mais de 20% de linfócitos atípicos. Esse quadro ocorre em torno de 70 a 80% dos casos. A trombocitopenia também é um achado característico; o CMV tem tropismo pelo megacariócito, e a queda do número de plaquetas dá-se por diminuição da produção; pode ocorrer também uma púrpura vascular por ação direta do vírus ao endotélio.<sup>1,2</sup> Anemia de causa imunológica, especificamente autoimune, com Coombs direto positivo, também está descrita na infecção pelo CMV.

O caso laboratorial descrito a seguir mostra o hemograma de uma criança de 9 meses com infecção pelo citomegalovírus. O que chamou a atenção durante a punção sanguínea foi a grande quantidade de petéquias. A **Tabela 10.1** mostra o resultado do hemograma.

**O eritrograma mostra uma anemia discreta normocítica e normocrômica sem alterações morfológicas significativas. O leucograma mostra uma leucocitose intensa à custa de linfocitose, com a presença de linfócitos atípicos, e há trombocitopenia. Esse quadro hematológico denota um processo viral pela linfocitose com presença de linfócitos atípicos e pela trombocitopenia. Após o resultado do hemograma, foram solicitados os seguintes exames: sorologia para toxoplasmose, mononucleose, pesquisa de anticorpo anti-Epstein-Barr e sorologia para CMV. A sorologia para CMV foi reagente e os demais exames não reagentes. Ao exame clínico, a criança apresentava febre, hepatoesplenomegalia e perda de peso.**

TABELA 10.1 Resultado do hemograma				
Eritrócitos	3.980.000	/µL		
Hemoglobina	10,3	g/dL		
Volume globular	30,1	%		
VCM	77,3	fL		
HCM	26,4	pg		
CHCM	34,2	%		
Leucócitos	25.000	/µL		
Bastonetes	09	%	2.250	/µL
Segmentados	12	%	3.000	/µL
Neutrófilos	21	%	5.250	/µL
Monócitos	03	%	750	/µL
Linfócitos	60	%	15.000	/µL
Linfócitos atípicos	16	%	4.000	/µL
Plaquetas			62.000	/µL

**DENGUE**  
Existem quatro tipos de vírus causadores da dengue, e todos têm como principal vetor o *Aedes aegypti*. A doença tem um período de incubação que varia de 2 a 7 dias, com início súbito, presença de febre (entre 39-40 °C), anorexia, dor de cabeça, dor retro-orbital, dor nas costas, artralgia e forte mialgia.<sup>1,2</sup> Pode ocorrer adenopatia, náuseas, vômitos, sangramentos gastrintestinais, petéquias e equimoses.<sup>1,2</sup>

A dengue hemorrágica caracteriza-se por alteração da integridade vascular e aumento da permeabilidade vascular na microcirculação associada com trombocitopenia e disfunção plaquetária, o que predispõe o paciente a hemorragias.<sup>1,2</sup> Pode ser desencadeado um quadro de coagulação intravascular disseminada com insuficiência renal, e o paciente pode evoluir ao choque com comprometimento do sistema nervoso central (encefalopatias, convulsões e coma).<sup>1,2</sup> A manifestação clínica desse quadro é a presença de petéquias, mais bem observadas na região axilar, e proteinúria.<sup>1,2</sup>

O leucograma apresenta leucopenia com neutropenia a partir do segundo dia do início da febre, podendo chegar a valores abaixo de 2.000 leucócitos/µL.<sup>1,2</sup> A trombocitopenia é um achado laboratorial característico e geralmente a contagem está abaixo de 100.000 plaquetas/µL.<sup>1,2</sup>



## ■ FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma infecção viral aguda transmitida ao homem pelo mosquito *Haemagogo* e outros mosquitos selvagens; torna-se urbana (febre amarela urbana) em áreas em que existe o mosquito *Aedes aegypti*, que se contamina ao picar uma pessoa infectada e passa a transmitir a febre amarela.<sup>1,2</sup>

O período de incubação é de 3 a 6 dias. As manifestações clínicas dão-se de modo súbito e incluem febre entre 39 a 39,5°C, calafrios, rosto enrijecido, olhos injetados, episódios de vômitos, náuseas, dores musculares, principalmente na panturrilha, prostração, dor de cabeça, irritabilidade, icterícia, hematemese (vômito com sangue: vômito negro), petéquias, epistaxe, melena, oligúria (diminuição do volume urinário) e anúria (supressão do volume urinário).<sup>1,2</sup> O hemograma pode apresentar anemia em consequência da hemorragia, leucopenia (número de leucócitos em torno de 1.500-2.500 leucócitos/ $\mu$ L geralmente no quinto dia da doença), neutropenia e trombocitopenia.<sup>1,2</sup> O aumento do tempo de protrombina e do tempo de tromboplastina parcial ativada e a diminuição do fibrinogênio sugerem a instalação de coagulação intravascular disseminada.<sup>1,2</sup>

## ■ HEPATITE VIRAL

A hepatite viral é uma infecção sistêmica que afeta o tecido hepático. Pode ser causada pelo vírus da hepatite A (HVA), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite delta (HDV) e vírus da hepatite E (HEV); com exceção do vírus da hepatite B (DNA vírus), os demais são RNA vírus.<sup>1,2</sup> A hepatite varia de uma forma assintomática até uma forma de infecção aguda fulminante e fatal.<sup>1,2</sup>

A hepatite A apresenta um período de incubação entre 15 a 45 dias, com replicação no tecido hepático. É uma doença aguda que acomete crianças e adultos jovens e tem transmissão orofecal.<sup>1,2</sup> É de gravidade leve, tem bom prognóstico e não se torna crônica. No final da fase de incubação e no período pré-ictérico, o vírus é encontrado, além do fígado, na bile, nas fezes e no sangue.<sup>1,2</sup> Anticorpos anti-HVA são detectados durante a fase aguda da doença, quando as transaminases estão aumentadas.<sup>1,2</sup>

A hepatite B tem um período de incubação entre 30 a 180 dias, com média em torno de 60 a 90 dias. É insidiosa ou de instalação aguda e acomete

adultos jovens e crianças; ocasionalmente, a doença pode ser grave e fulminante em 0,1 a 1% dos casos.<sup>1,2</sup> A transmissão dá-se por via sexual, percutânea e perinatal. Progride para a cronicidade em 1 a 10% dos casos em adultos; nos recém-nascidos, a cronicidade está em torno de 90% dos casos. Apresenta entre 0,1 a 30% de portadores, e o prognóstico piora com a idade.<sup>1,2</sup>

A hepatite C tem um período de incubação entre 15 a 160 dias, com média de 50 dias. É uma doença insidiosa que acomete qualquer faixa etária, sendo mais comum entre adultos e fulminante em 0,1% dos casos.<sup>1,2</sup> A cronicidade é comum (50-70 % das hepatites crônicas), e o prognóstico desfavorável.<sup>1,2</sup>

A hepatite D tem um período de incubação entre 30 a 180 dias, com média em torno de 60 a 90 dias. Instala-se de forma insidiosa ou aguda, acometendo qualquer faixa etária, com transmissão percutânea, perinatal e sexual.<sup>1,2</sup> De gravidade ocasionalmente significativa, sendo fulminante em 5 a 20% dos casos, em 10% dos casos progride para a cronicidade, é de bom prognóstico para a fase aguda, mas não para a crônica.<sup>1,2</sup>

A hepatite E tem um período de incubação entre 14 a 60 dias, com média em torno de 40 dias. É uma doença que se instala de forma aguda, acomete adultos jovens entre 20 a 40 anos, e em torno de 1 a 2% dos casos é fulminante.<sup>1,2</sup> É transmitida via orofecal, não progride para a cronicidade e é de bom prognóstico.<sup>1,2</sup>

No período pré-ictérico, o leucograma apresenta leucopenia com neutropenia, podendo ou não apresentar desvio nuclear à esquerda. No período ictérico, a leucopenia é substituída por leucocitose à custa de linfocitose; nessa fase, surgem os linfócitos atípicos, os quais variam muito em número (pode ser superior a 40%) e morfologia.<sup>1,2</sup> Na convalescença, o leucograma retorna aos níveis normais, mas os linfócitos atípicos podem persistir por 2 a 3 meses.<sup>1,2</sup>

## ■ MONONUCLEOSE INFECCIOSA

A mononucleose infecciosa (MNI) tem como agente etiológico o vírus Epstein-Barr (EBV), que foi descrito pela primeira vez por Epstein, Achong e Barr a partir de cultura de linfoblastos de pacientes com linfoma de Burkitt.<sup>1,2</sup> É um vírus da família dos vírus herpes que causa um processo infeccioso que pode ser primário ou latente.<sup>4</sup> É uma doença que ocorre normalmente na faixa



etária entre 10 a 40 anos. Quando ocorre acima de 40 anos, em geral é mais grave;<sup>3</sup> é uma doença de evolução benigna na maioria dos casos, podendo apresentar complicações sérias.

A infecção primária inicia pela orofaringe, onde as células da mucosa epitelial ou os linfócitos B tornam-se infectados.<sup>4</sup> O vírus liga-se aos receptores dos linfócitos B (CD21 e C3d = receptor do complemento),<sup>4</sup> seu material genético penetra a célula e localiza-se no *locus* do gene para o complexo maior de histocompatibilidade.<sup>3</sup> Durante a primeira semana de instalação da doença, ocorre a proliferação de linfócitos B infectados pelo vírus<sup>3</sup> e proliferação da partícula viral, que infecta outras células e é secretada na saliva.<sup>4</sup> Durante a infecção primária, o vírus torna-se latente dentro dos linfócitos B, latência que pode perdurar durante vários anos.<sup>4</sup> Os linfócitos T *helper*, em função dos linfócitos B infectados, estimulam linfócitos B normais a produzirem imunoglobulinas específicas.<sup>3</sup> A produção de anticorpos ativa linfócitos T, fazendo com que eles retornem à forma blástica, proliferem e adquiram o potencial citotóxico; o aparecimento de linfócitos atípicos (linfócitos T ativados = potencial citotóxico) reflete a ativação dos linfócitos T.<sup>3</sup> A produção de anticorpos contra proteínas da membrana viral impede a proliferação viral, mas a resposta celular imune (linfócitos T) é essencial para controlar a infecção primária e latente pelo EBV.<sup>4</sup> Geralmente, a contaminação se dá via portador do vírus EB e não a partir do paciente com infecção aguda.<sup>1,2</sup>

Pessoas com o sistema imunológico normal conseguem parar a proliferação de linfócitos B infectados e debelar a doença. Pessoas com alguma doença imunológica ou imunodeprimidas podem apresentar as complicações da doença: pneumonite, meningoencefalite, pericardite e hepatite, todas complicações correlacionadas com infiltração linfocítica.<sup>3</sup> Obstrução das vias aéreas por aumento do tecido linfóide da faringe e ruptura do baço, quando a esplenomegalia está presente, podem ocorrer como outras complicações clínicas.<sup>3</sup>

Nos primeiros dias do início da doença, o leucograma apresenta leucopenia a custas de neutropenia e linfopenia, mas, ao final da primeira semana, a leucopenia é substituída por um quadro de leucocitose (geralmente entre 10.000-20.000 leucócitos/microlitro em 60-70% dos pacientes; em 15% dos pacientes, a leucocitose pode ser superior 20.000 leucócitos/microlitro) com linfocitose

(geralmente acima de 5.000 linfócitos/microlitro) e com mais de 20% de linfócitos atípicos; as três morfologias de linfócitos atípicos são vistas com predomínio da morfologia monocitoide.<sup>3</sup> Os linfócitos atípicos são vistos no sangue 4 ou 5 dias após o início da doença e podem persistir até 30 dias; uma contagem de linfócitos atípicos de 40% ou mais é fortemente sugestiva de MNI.<sup>3</sup> Pode ocorrer monocitose e eosinofilia (explicada pela produção de IL-5 pelos linfócitos). As complicações hematológicas incluem anemia, neutropenia, trombocitopenia e raramente anemia aplástica.<sup>4</sup> Anemia hemolítica de causa imunológica ocorre em 3% dos pacientes, com início nas duas primeiras semanas da doença, deixando de se manifestar dentro de 1 a 2 meses; o teste de Coombs direto é positivo.<sup>4</sup> A neutropenia é discreta e não está associada com processos infecciosos; é um achado comum nas primeiras quatro semanas da doença.<sup>4</sup> A trombocitopenia geralmente é discreta, com a contagem de plaquetas variando entre 50.000 a 150.000 plaquetas/microlitro, está presente nas duas primeiras semanas da doença, e os valores da contagem plaquetária retornam ao normal dentro de dois meses.<sup>4</sup> A trombocitopenia aparentemente ocorre por causa secundária, pela ação de anticorpos antiplaquetários ou pelo hiperesplenismo, porque a medula mostra número normal ou aumentado de megacariócitos.<sup>4</sup>

## ❖ SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

A síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) é uma infecção causada pelo HIV, um retrovírus que induz uma infecção celular crônica, a qual é caracterizada por longos períodos de latência. Ele pode ser transmitido pelo contato sexual, pelo uso de drogas endovenosas, em transfusões sanguíneas ou uso de hemoderivados e na exposição perinatal.<sup>1,2</sup>

Todas as células que expressam CD4 (linfócitos T *helper*, monócitos, macrófagos, células de Langerhan's, células dendríticas, megacariócitos e células tímicas) são suscetíveis de se infectarem pelo HIV, porque o CD4 é um receptor para o vírus.<sup>1,2</sup> Uma vez ligado ao CD4, o vírus incorpora seu envelope à membrana citoplasmática da célula hospedeira, internalizando o nucleocapsídeo. O RNA viral, por ação da transcriptase reversa e da DNA polimerase, faz uma dupla fita de cDNA (pró-vírus), que se integra ao genoma celular.



Posteriormente à integração, a replicação viral pode ser iniciada ou ficar em forma latente.<sup>1,2</sup>

A infecção pelo HIV resulta em uma regulação alterada do sistema imunológico, com depleção dos linfócitos T CD4+, defeitos na imunidade humoral e diminuição da atividade dos linfócitos T NK (*natural killer*).<sup>1,2</sup> Os macrófagos passam a ser os reservatórios do HIV. Os defeitos na imunidade humoral levam à produção de anticorpos autoimunes, predispondo o paciente a um risco aumentado de linfomas e de produção de anticorpos contra eritrócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas.<sup>1,2</sup>

A neutropenia ocorre em cerca de 10% dos pacientes assintomáticos e, na fase inicial da doença e em cerca de 50% dos pacientes com a síndrome da imunodeficiência associada ao HIV.<sup>1,2</sup> A CFU-GM (unidade formadora de colônias de macrófagos e granulócitos, do inglês *colony forming unit for granulocytes and macrophage*) está diminuída, com consequente diminuição na produção de monócitos, macrófagos e neutrófilos.<sup>1,2</sup> O G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos, do inglês *granulocyte colony stimulating factor*) também está diminuído, contribuindo para a diminuição do número de neutrófilos.<sup>1,2</sup> Além da neutropenia, ocorre uma diminuição na função dos neutrófilos e monócitos. Quando o número de neutrófilos está abaixo de 1.000 neutrófilos/microlitro, o risco de infecções bacterianas aumenta em 2 a 3 vezes; quando está abaixo de 500 neutrófilos/microlitro, o risco é de 7 a 9 vezes.<sup>1,2</sup> A infecção bacteriana instala-se 24 horas após o início da neutropenia em 24% dos pacientes.<sup>1,2</sup>

A trombocitopenia ocorre em torno de 40% dos pacientes e, em 10%, é o primeiro sinal da doença. A queda no número de plaquetas dá-se pelo aumento da destruição plaquetária via fagocitose pelos macrófagos do baço (devido à produção de anticorpos antiplaquetários) e pelo fato de o HIV infectar os megacariócitos.<sup>1,2</sup>

## ANOMALIAS LEUCOCITÁRIAS

### ANOMALIA DE PELGER-HÜET

É uma anomalia benigna, de herança autossômica dominante com uma frequência de 1 afetado a cada 6 mil nascimentos que tem como característica a falta de diferenciação final dos neutrófilos<sup>14</sup> que, morfológicamente, apresentam uma diminuição na segmentação do núcleo. Nos heterozigotos, o

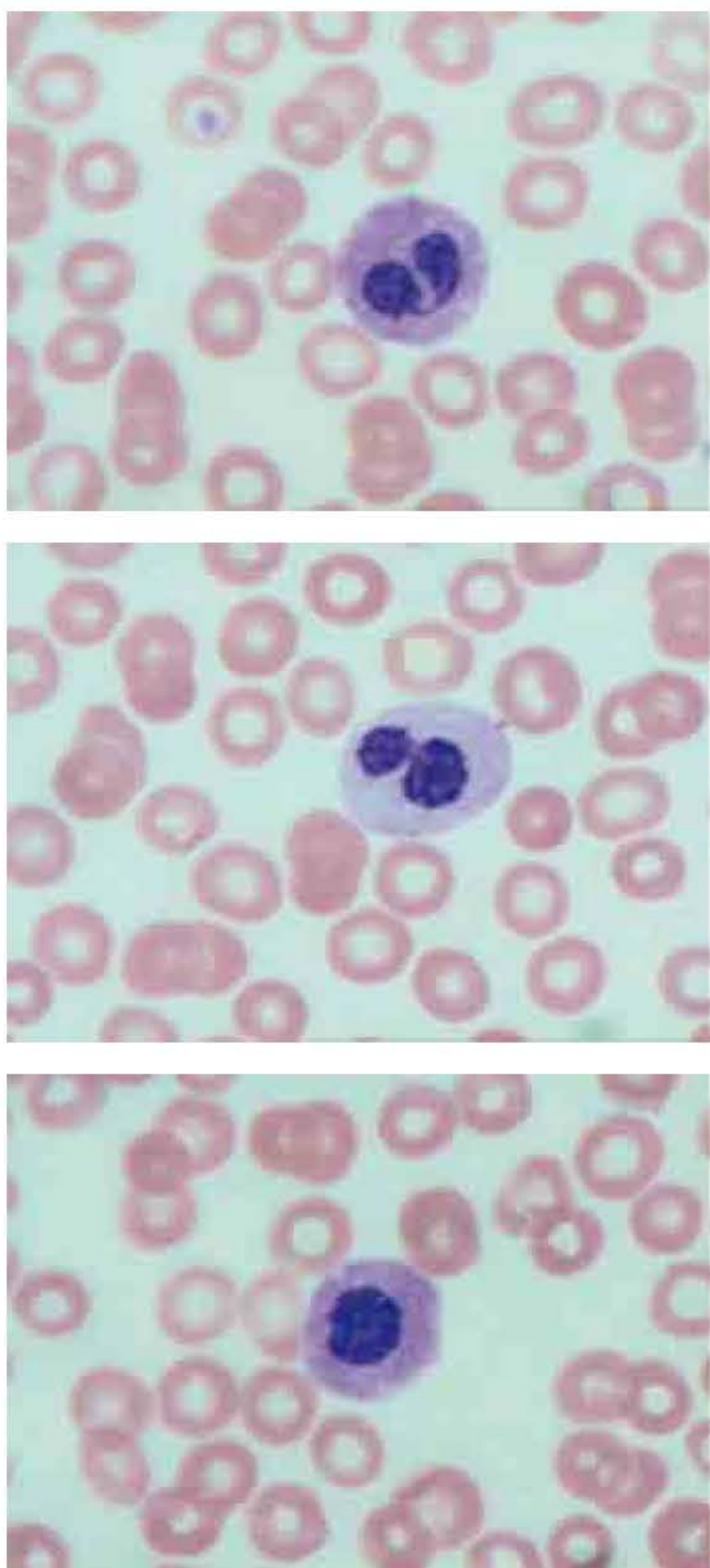
núcleo apresenta-se com dois lóbulos, mais arredondados que o normal e em forma de óculos ou *pince-nez* e também em forma de halteres ou amendoins, com acentuada condensação cromatínica.<sup>1,2</sup> No hemograma dos heterozigotos, encontra-se um aparente desvio nuclear à esquerda dos neutrófilos.<sup>1,2</sup> Nos homozigotos, os neutrófilos apresentam núcleos ovais ou redondos, excêntricos e com cromatina mais condensada, lembrando morfológicamente um mielócito ou metamielócito.<sup>1,2</sup> A forma adquirida da anomalia de Pelger-Hüet (denominada por alguns autores como pseudo-Pelger)<sup>4</sup> pode ocorrer no curso de infecções agudas,<sup>4</sup> leucemia mieloide crônica<sup>4</sup> e mielofibrose<sup>1,2,4</sup> e na vigência de medicamentos como colchicina,<sup>4</sup> sulfonamidas,<sup>4</sup> ibuprofeno,<sup>4</sup> taxoides<sup>4</sup> e valproatos.<sup>4</sup> Ocasionalmente, pode ser observada após quimioterapia.<sup>1,2</sup>

É muito importante fazer a distinção entre um verdadeiro desvio nuclear à esquerda, observado, por exemplo, em um quadro infeccioso, e um desvio nuclear à esquerda devido à anomalia de Pelger-Hüet, uma vez que nesta o desvio à esquerda é desprovido de significado clínico.<sup>1,2</sup> A **Figura 10.2** mostra fotos de neutrófilos com anomalia de Pelger-Hüet.

### SÍNDROME DE CHEDIAK-HIGASHI

É uma síndrome rara, de herança autossômica recessiva, que se caracteriza pela presença de lisossomos gigantes nos leucócitos e em outras células do organismo.<sup>4</sup> Os neutrófilos apresentam grânulos grandes resultantes da fusão de granulações primárias e secundárias. Esses grânulos são mais proeminentes na medula óssea que no sangue periférico devido à destruição intramedular de precursores mieloides.<sup>4</sup> Em função dessa destruição, o paciente apresenta um número de neutrófilos que varia entre 500 a 2.000 neutrófilos/microlitro.<sup>4</sup> Além da neutropenia, os grânulos são deficientes em substâncias antimicrobianas, o que predispõe o paciente a infecções bacterianas de recorrência e, muitas vezes, fatais.<sup>4</sup> Os monócitos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos mostram grânulos gigantes no citoplasma e há perda de função dessas células, perda da capacidade de fagocitose nos monócitos e macrófagos e perda da capacidade citotóxica dos linfócitos T e NK.<sup>4</sup> As plaquetas apresentam uma incapacidade de armazenar adenosina difosfato (ADP) e serotonina, acarretando uma deficiência na agregação plaquetária e predispondo o paciente a sangramentos.<sup>4</sup>

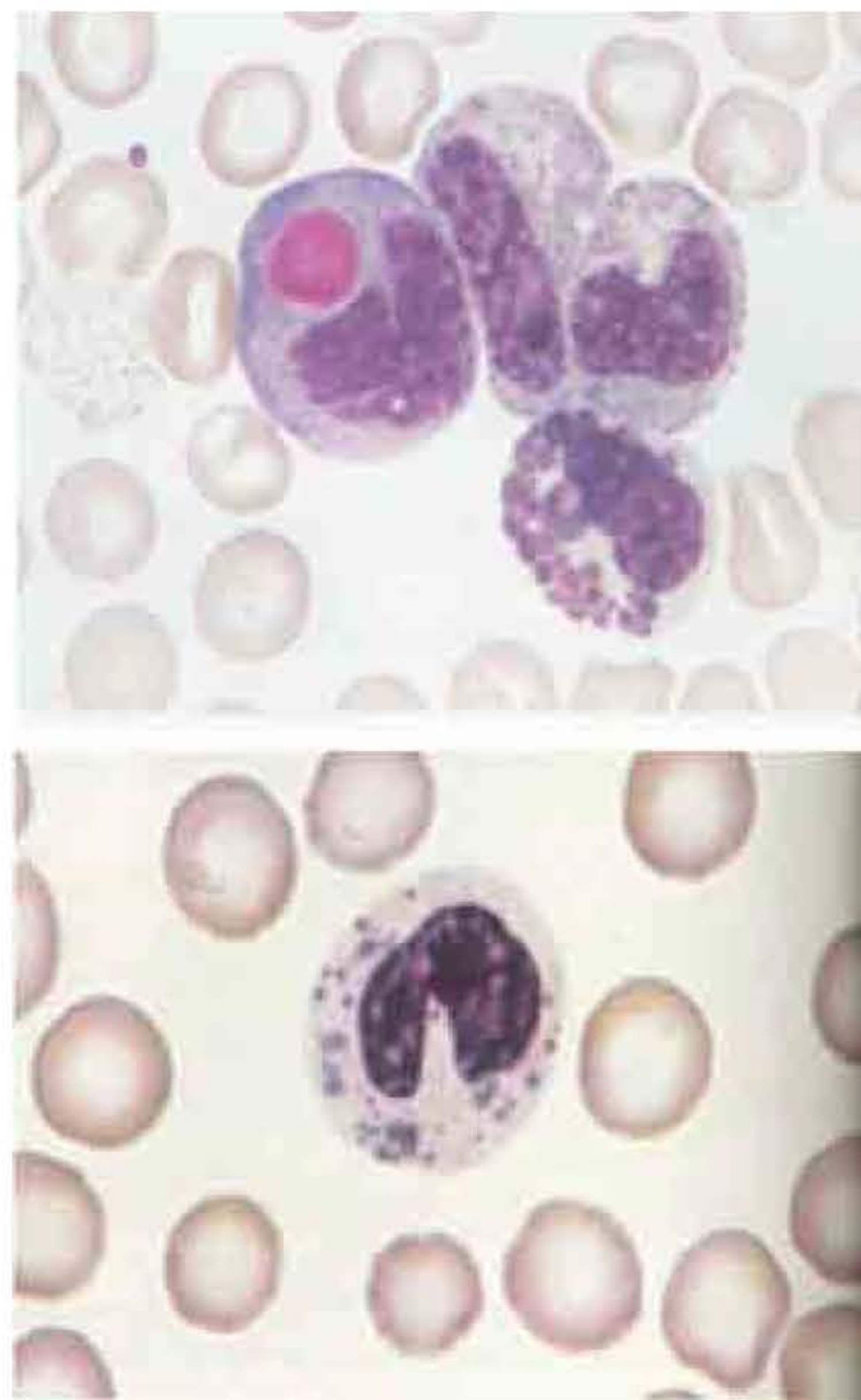




**FIGURA 10.2** Neutrófilos com anomalia de Pelger Hüet.

A forma homozigota apresenta um quadro clínico grave, praticamente incompatível com a vida, devido à grande suscetibilidade às infecções bacterianas.<sup>1,2</sup> Na forma heterozigota, a presença dessas granulações está associada, muitas vezes, à consanguinidade entre os pais do paciente, além de albinismo parcial ou total, adeno-hepatoesplenomegalia e manifestações neurológicas variáveis.<sup>1,2</sup> O diagnóstico dessa síndrome é feito pela visualização de grânulos gigantes (grânulos lisossomais peroxidase-positivos) nos leucócitos sanguíneos e nas células mieloides da medula óssea.<sup>4</sup>

É possível fazer o diagnóstico pré-natal porque os amniócitos e as células da vilosidade coriônica exibem os mesmos grânulos.<sup>4</sup> A **Figura 10.3** mostra fotos de leucócitos com a síndrome de Chediak-Higashi.



**FIGURA 10.3** Leucócitos com a síndrome de Chediak-Higashi.

#### ■ ANOMALIA DE MAY-HEGLIN

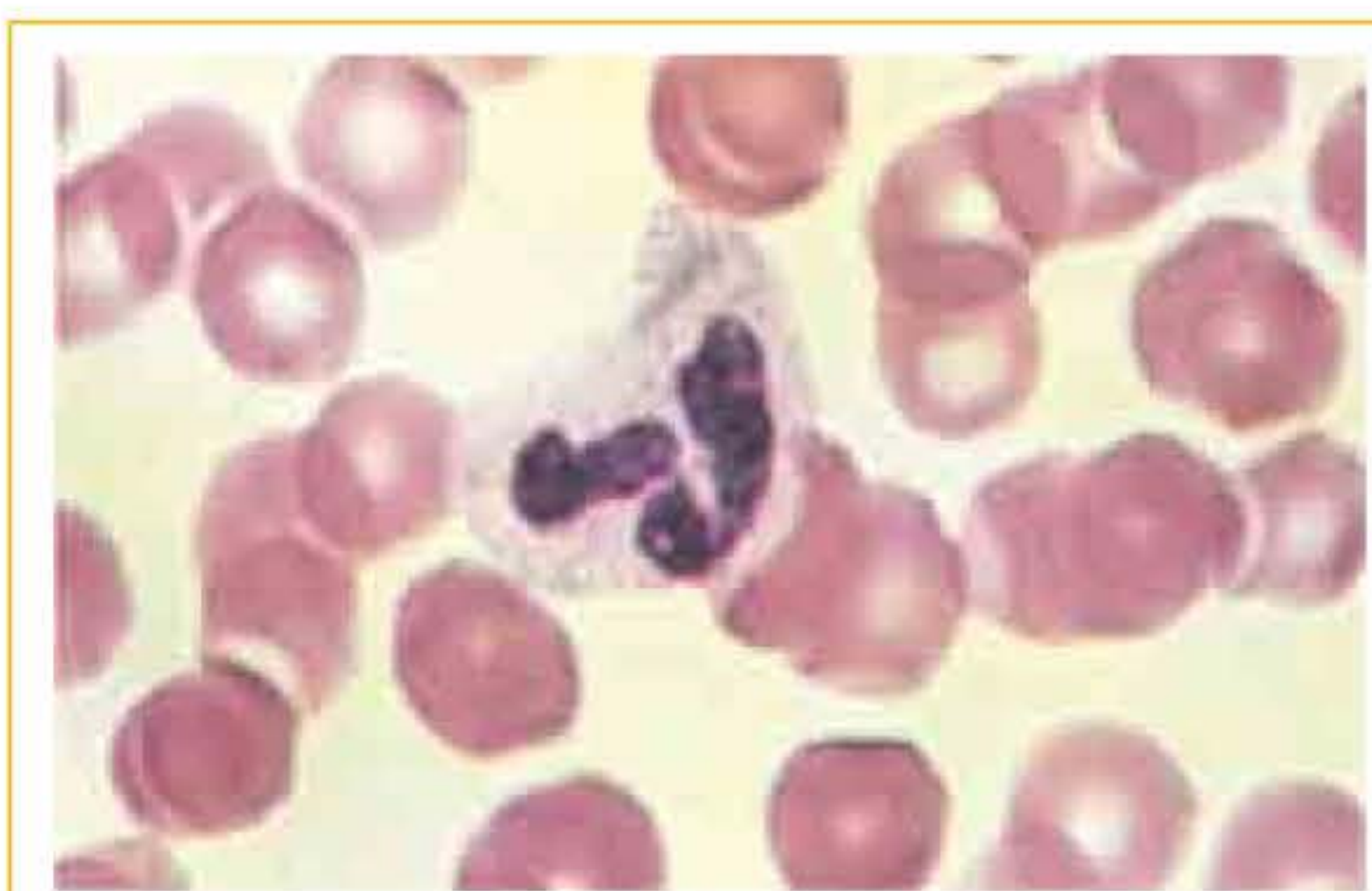
A anomalia de May-Hegglin também recebe a denominação de trombocitopenia familiar associada com inclusões leucocitárias<sup>4</sup>, e o padrão de herança é autossômico dominante.<sup>5</sup> A trombocitopenia varia de discreta a moderada e está associada à presença de plaquetas gigantes, cujo tamanho varia entre 30 a 80 fL. Apesar dessa característica morfológica, as plaquetas são funcionais, o aumento do tempo de sangramento está associado à intensidade da trombocitopenia<sup>4</sup>, e a possibilidade de o paciente sangrar também é proporcional à intensidade da trombocitopenia.<sup>5</sup> As inclusões leucocitárias estão presentes nos neutrófilos, eosinófilos, basófilos e, mais raramente, nos monócitos<sup>4</sup> e caracterizam-se por



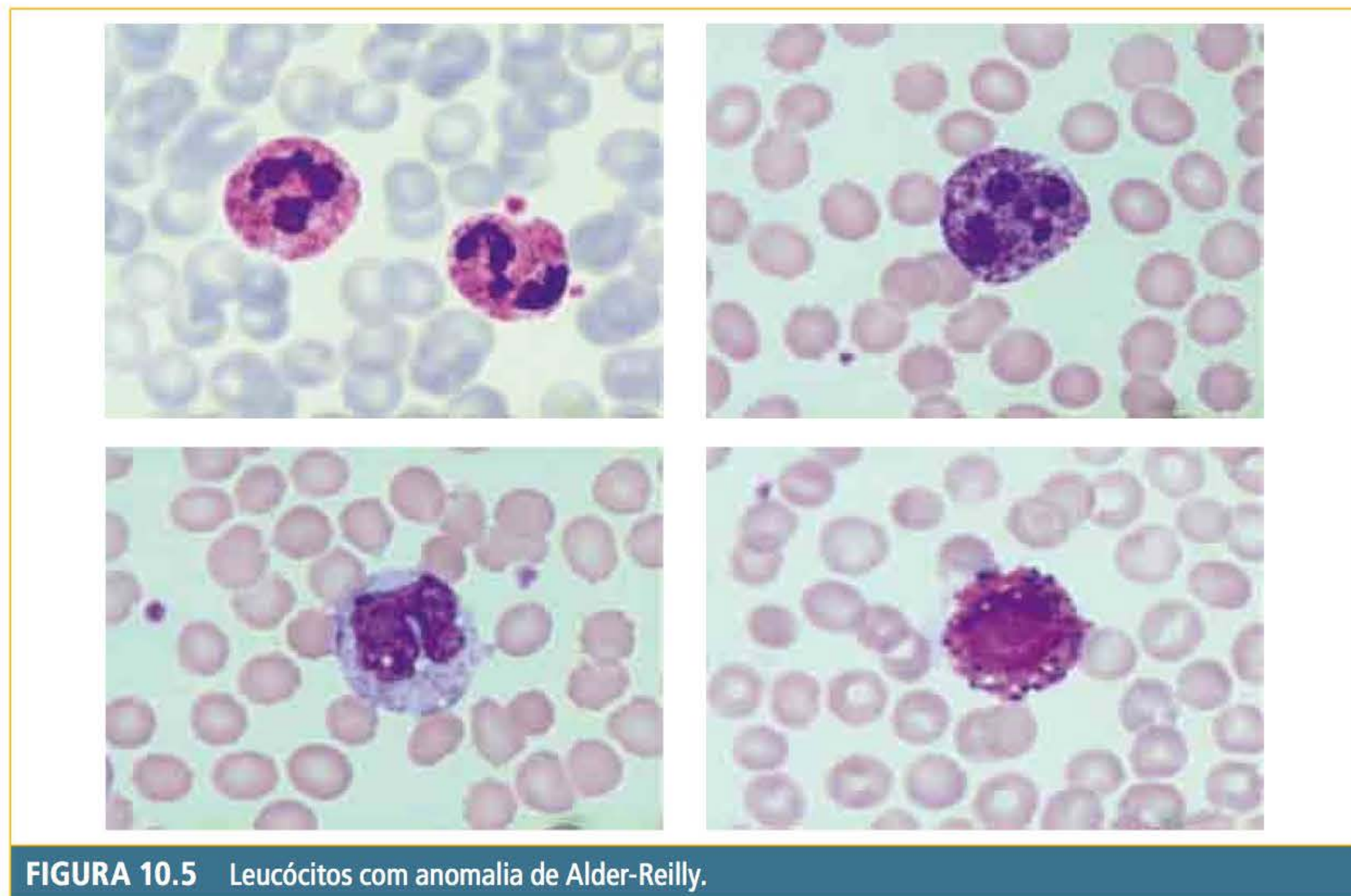
serem granulações grandes e acinzentadas, que lembram corpúsculos de Döhle.<sup>1,2,4</sup> **São estruturas relacionadas com os ribossomos e são encontradas nos** neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos. A **Figura 10.4** mostra fotos de leucócitos com a anomalia de May-Hegglin.

#### ANOMALIA DE ALDER-REILLY

A anomalia de Alder-Reilly é uma mucopolissacaridose<sup>6</sup> que tem como característica morfológica a presença de grânulos vermelho-escuros ou púrpura, que lembram granulações tóxicas, nos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e, raramente, nos linfócitos.<sup>1,2</sup> É herdada de modo autossômico recessivo<sup>7</sup> e não está correlacionada com alteração da função leucocitária<sup>7,8</sup>. A **Figura 10.5** mostra fotos de leucócitos com anomalia de Alder-Reilly.



**FIGURA 10.4** Leucócitos com a síndrome de May-Hegglin.



**FIGURA 10.5** Leucócitos com anomalia de Alder-Reilly.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do leucograma. São Paulo: Robe; 2003.
2. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. Hematologia laboratorial. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.
3. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology principles, procedures, correlations. 2nd ed. New York: Lippincott; 1998.
4. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. Hematology basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
5. Silva PH, Hashimoto Y. Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária. Rio de Janeiro: Revinter; 2006.
6. Lichtmann MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
7. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, et al. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
8. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.



### ONCOGÊNESE

O número normal de cromossomos de uma célula (cariótipo) é 46 (diploidia). Situações em que o número de cromossomos é anormal são denominadas de aneuploidias, sendo hipoploidia uma diminuição e hiperploidia um aumento nesse número. As alterações cromossômicas podem ainda ser classificadas em numéricas ou estruturais.<sup>1,2</sup>

As alterações numéricas são representadas pela perda ou ganho no número de cromossomos. Por exemplo, uma linhagem celular com uma perda de um cromossomo 8 terá um cariótipo 45, XY ou XX, -8, ou seja, uma monossomia desse cromossomo e, no caso de um ganho, caracterizará uma trissomia, determinando um cariótipo do tipo 47, XY ou XX, +8. Podem ocorrer monossomia ou trissomia em mais de um tipo de cromossomo.<sup>1,2</sup>

As alterações estruturais são representadas pela perda de parte de um cromossomo (deleção), pela troca de segmentos entre dois cromossomos (translocação) ou pelo ganho de um segmento cromossômico (adição). Essas alterações são representadas, por exemplo: del(8q) – deleção no braço longo do cromossomo 8; del(5)(q13a33) – deleção no braço longo do cromossomo 5, entre as regiões 13 e 33; t(9;22)(q34;q11) – translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, nas posições 34 e 11; 14q+ – aumento do braço longo do cromossomo 14. Os efeitos resultantes dessas alterações são entendidos, atualmente, como ativação de oncogenes nas translocações e aumento e diminuição de material genético nas adições e deleções, respectivamente.<sup>1,2</sup>

Nas últimas décadas, grandes avanços têm sido alcançados no entendimento de tumores, entre os quais o de que a carcinogênese é compreendida como um processo de múltiplas etapas, em que uma sucessão de eventos ordenados é necessária, determinando três fases de evolução, denominadas de **iniciação**, **promoção** e **progressão**. Esse processo envolve, de forma geral, diretamente, alterações mutagênicas, principalmente em genes com funções de estímulo e de controle dos mecanismos fisiológicos de proliferação, maturação e diferenciação celular, denominados de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, respectivamente. Como consequência, perda do controle ou estímulos proliferativos anormais estarão presentes nas células mutadas e serão os responsáveis pelo desenvolvimento da massa tumoral.<sup>1,2</sup>

A **iniciação** é compreendida como o primeiro passo para o desenvolvimento neoplásico; nessa fase, ocorre a mutação gênica e de forma irreversível, não no sentido de evolução para as fases seguintes, pois esse fato poderá ou não ocorrer, mas no sentido de que uma célula mutada permanecerá sempre como tal. A fase da **promoção** é dependente de agentes promotores envolvidos no processo de proliferação clonal, os quais, geralmente, não possuem capacidade de iniciação, embora isso seja possível e, quando isso ocorre, são denominados de



carcinógenos completos. Muitos agentes promotores são os próprios elementos biológicos, entre os quais fatores de crescimento, hormônios e citocinas. A fase da **progressão** está associada ao desenvolvimento tumoral propriamente dito, incluindo a presença de novas mutações e consequentes subclones tumorais.<sup>1,2</sup>

▀ **PROTO-ONCOGENES E ONCOGENES**

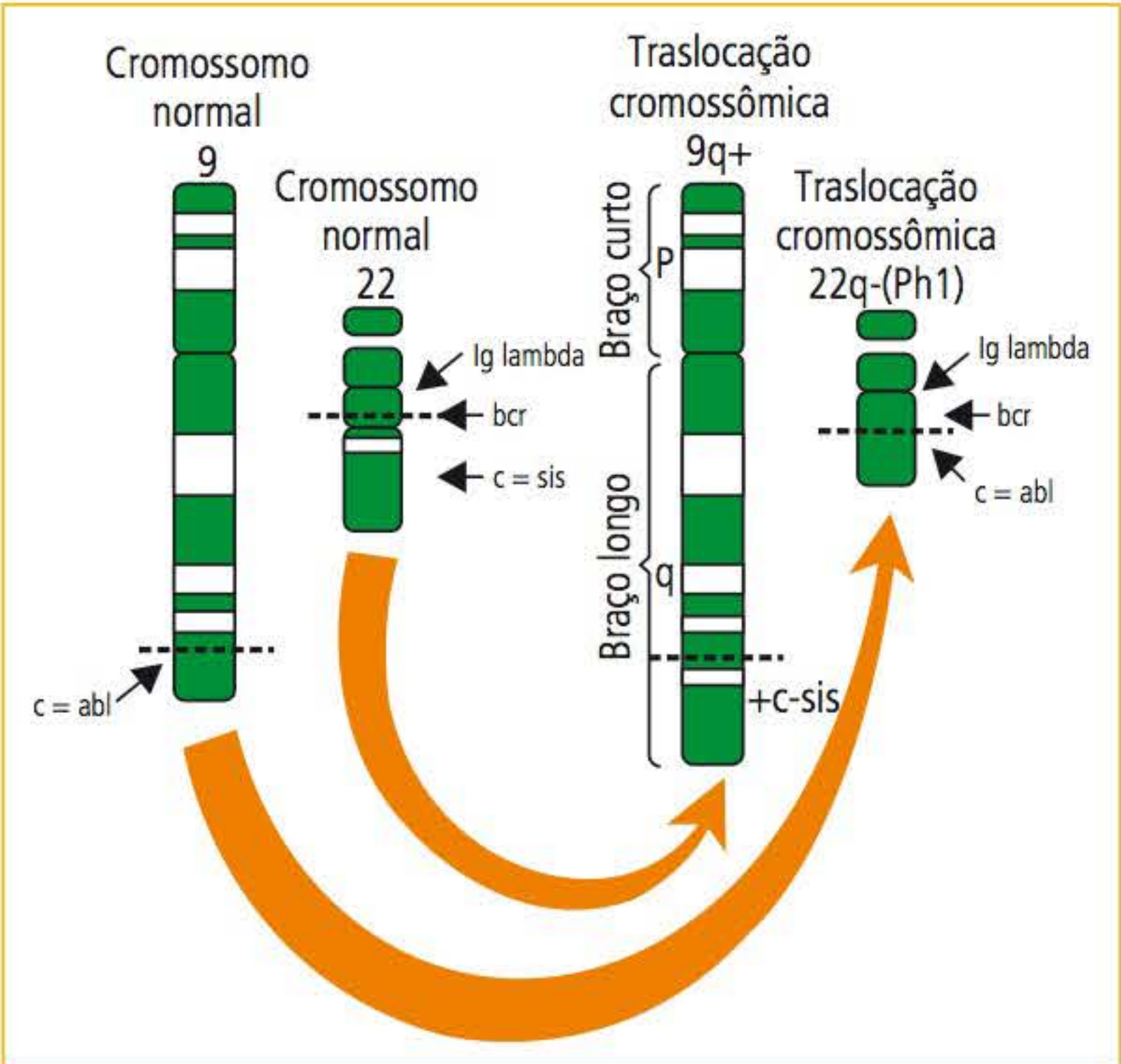
Os genes mais comuns envolvidos com o desenvolvimento de tumores são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumores, sendo que os proto-oncogenes estão envolvidos com os processos de estímulo e controle do ciclo celular, e os supressores de tumores, com os mecanismos de reparo do DNA.<sup>3</sup> Proto-oncogenes mutados são denominados de oncogenes. Os oncogenes foram descritos pela primeira vez em vírus que causam doenças malignas em animais; o primeiro vírus descrito foi o vírus do sarcoma de Rous, causador de sarcoma em aves, o qual recebeu a sigla *SRC*.<sup>1-4</sup> Na década de 1970, foi descoberto que a origem desses genes (proto-oncogenes) era de células normais de eucariontes (mamíferos) e que esses genes são altamente preservados na escala evolutiva pelo fato de controlarem funções celulares importantes, como a divisão celular, a maturação e a inibição do desenvolvimento de tumores. Na década de 1980, com o desenvolvimento das técnicas de hibridização, foi possível saber a localização cromossômica desses genes<sup>2-4</sup> (**Tabela 11.1**). Os oncogenes, na sua grande maioria, são oriundos de mutações somáticas causadas por mutações de

ponto, translocações cromossômicas, deleções e amplificação gênica. Nas neoplasias hematológicas, as alterações provocadas por quebras cromossômicas são as causas mais comuns, principalmente as translocações, as quais produzem rearranjos com modificações nas sequências originais das bases nitrogenadas, produzindo, dessa forma, proteínas modificadas (oncoproteínas). As oncoproteínas acabam desencadeando desvios funcionais, tais como aumento, diminuição, perda ou mesmo inversão da capacidade funcional ou, às vezes, modificação completa da sua função. Um exemplo característico é a translocação que ocorre na leucemia pró-mielocítica aguda, entre o cromossomo 15 e o 17, t(15;17). Essa translocação faz com que seja produzido um receptor do ácido retinoico com distribuição celular anormal, tendo como consequência a inibição da maturação dos pró-mielócitos, levando a que todos os precursores granulocíticos permaneçam nesse estágio de maturação.<sup>3</sup> Outro exemplo característico, e que foi a primeira translocação relacionada com o desenvolvimento de leucemia, é a translocação que ocorre na leucemia mieloide crônica, entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, t(9;22) (q34;q11). Habitualmente, o local de quebra no braço longo do cromossomo 9 acontece na posição 34, onde existe um proto-oncogene denominado de *ABL*, o qual, após a quebra cromossômica, é incorporado ao braço longo do cromossomo 22, na região 11, juntamente com outro gene que fica nessa posição chamado *BCR*. A junção desses dois genes (*BCR-ABL*) tem como produto uma proteína

TABELA 11.1 Alguns oncogenes envolvidos com neoplasias hematológicas, sua localização cromossômica, função e associação com neoplasias <sup>7</sup>			
ONCOGENE	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	FUNÇÃO	ASSOCIAÇÃO COM NEOPLASIAS
<i>ABL</i> (vírus da leucemia murina de Abelson)	9q34.1	Tirosinoquinase	Neoplasias linfoides e mieloides
<i>ERG</i> (vírus da eritroblastose aviária)	21q22.3	Fator de transcrição	Leucemia mieloide aguda
<i>FGR</i> (vírus do sarcoma felino de Gardner-Rasheed)	1p36-p36.1	Tirosinoquinase	Leucemias mieloides
<i>KIT</i> (vírus do sarcoma felino de Hardy-Zuckerman)	4p11-p12	Receptor de tirosinoquinase	Leucemia mieloide aguda
<i>MYB</i> (vírus da mieloblastose aviária)	6q22-q23	Fator de transcrição	Neoplasias hematológicas
<i>MYC</i> (vírus do mielocitoma)	8q24.12-q24.13	Fator de transcrição	Neoplasias linfoides e mieloides
<i>RAR</i> (receptor do ácido retinoico)	17q12	Fator de transcrição	Leucemia pró-mielocítica aguda
<i>RAS</i> (vírus do sarcoma de Harvey)	Várias	Proteína G	Neoplasias mieloides
<i>SRC</i> (vírus do sarcoma de Rous)	20q11.2-q12	Tirosinoquinase	Linfomas



(oncoproteína) quimérica com função de tirosino-quinase, ou seja, ativadora de sinal de transdução celular citoplasmático, de modo diferente daquela produzida normalmente e com capacidade funcional muito exacerbada.<sup>5</sup> Isso desencadeia uma proliferação clonal intensa dessas células, o que caracteriza esse tipo de leucemia, a hiperplasticidade (leucocitose) extrema (**Figura 11.1**). Mais de uma centena de oncogenes já foram descritos na literatura, e a maioria deles está envolvida com a patogênese e o desenvolvimento de tumores, principalmente nas neoplasias hematológicas.<sup>5</sup>

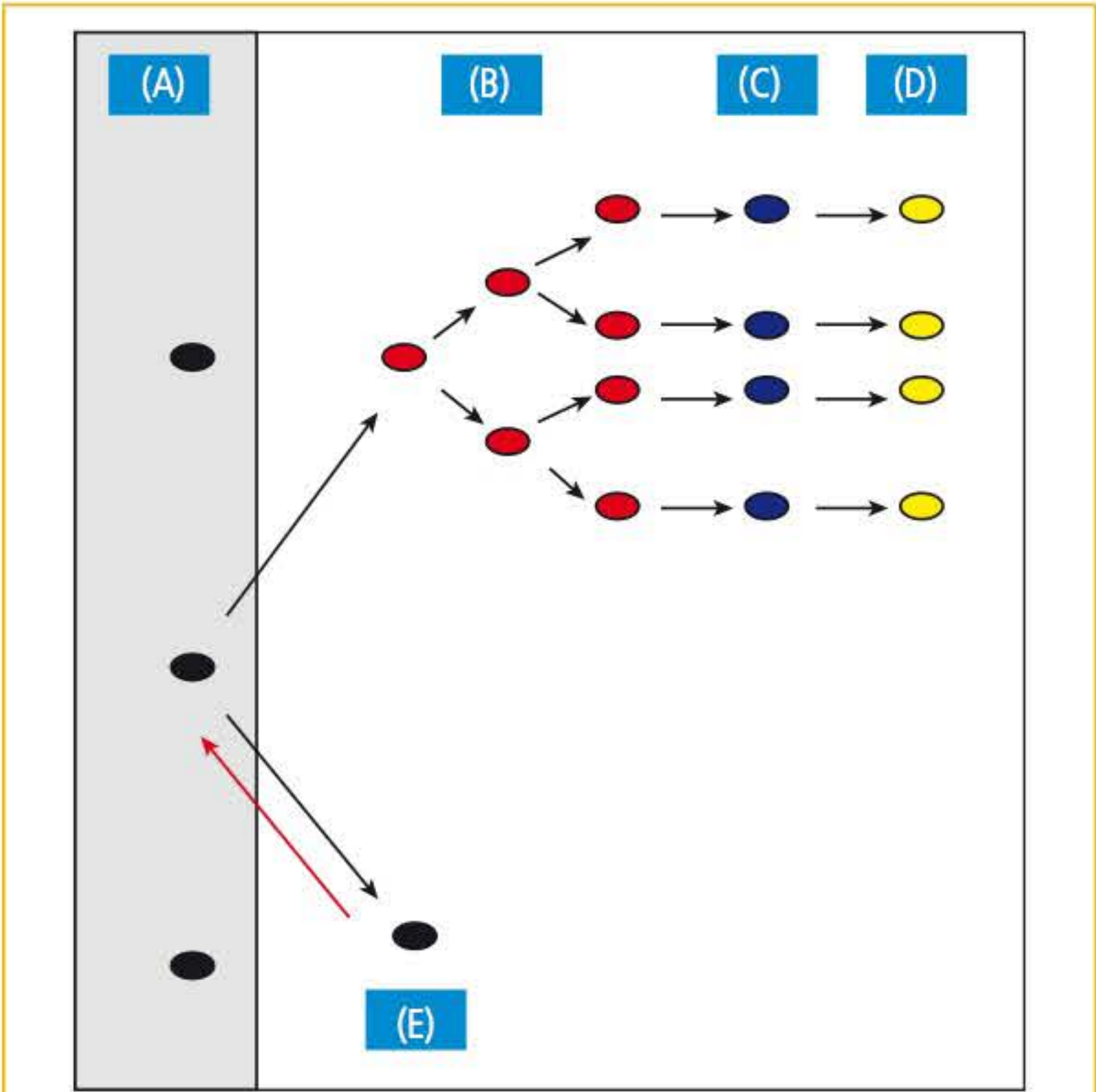


**FIGURA 11.1** Esquema da t(9;22)(q34;q11) na leucemia mieloide crônica.

Os genes supressores de tumor são genes que controlam o processo de proliferação celular, principalmente durante o ciclo celular, funções que são essenciais para a manutenção da integridade do genoma. Quando mutações somáticas acarretam a perda funcional desses genes, a capacidade de reparação do dano ou de indução dessa célula para apoptose é perdida.<sup>3</sup>

Atualmente, pressupostos têm demonstrado que os tecidos, de forma geral, são organizados de maneira que o acúmulo progressivo de mutações nas células seja minimizado. Esse fato é compreendido quando se observa que a maior parte da atividade mitótica dos tecidos e, por conseguinte, maior exposição às mutações, pertence às células chamadas de amplificadoras transitórias, que servem como intermediárias entre uma célula-tronco e seus descendentes diferenciados e não as células-tronco propriamente ditas. Esse mecanismo

existe para que alterações genômicas sejam perdidas ou descartadas, levando-se em conta que as células amplificadoras transitórias, após sucessivas divisões, entram em um estado pós-mitótico altamente diferenciado, evoluindo para morte celular e dificultando a tumorigênese. Diferentemente, as células-tronco que, embora estejam representadas quantitativamente em um número muito inferior, aproximadamente 0,1 a 1% da população celular total (valor esse estimativo e não de observação direta), estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento de tumores. Duas características presentes nas células-tronco estão relacionadas com esse envolvimento: capacidade de autorrenovação, que permite a manutenção do número de células desse compartimento e que compreende estado mitótico permanente, e tempo de meia-vida extremamente longo. Esses dois fatores possibilitam a permanência de mutações gênicas nas células, bem como a passagem dessas mutações para as células-filhas<sup>1</sup> (**Figura 11.2**).



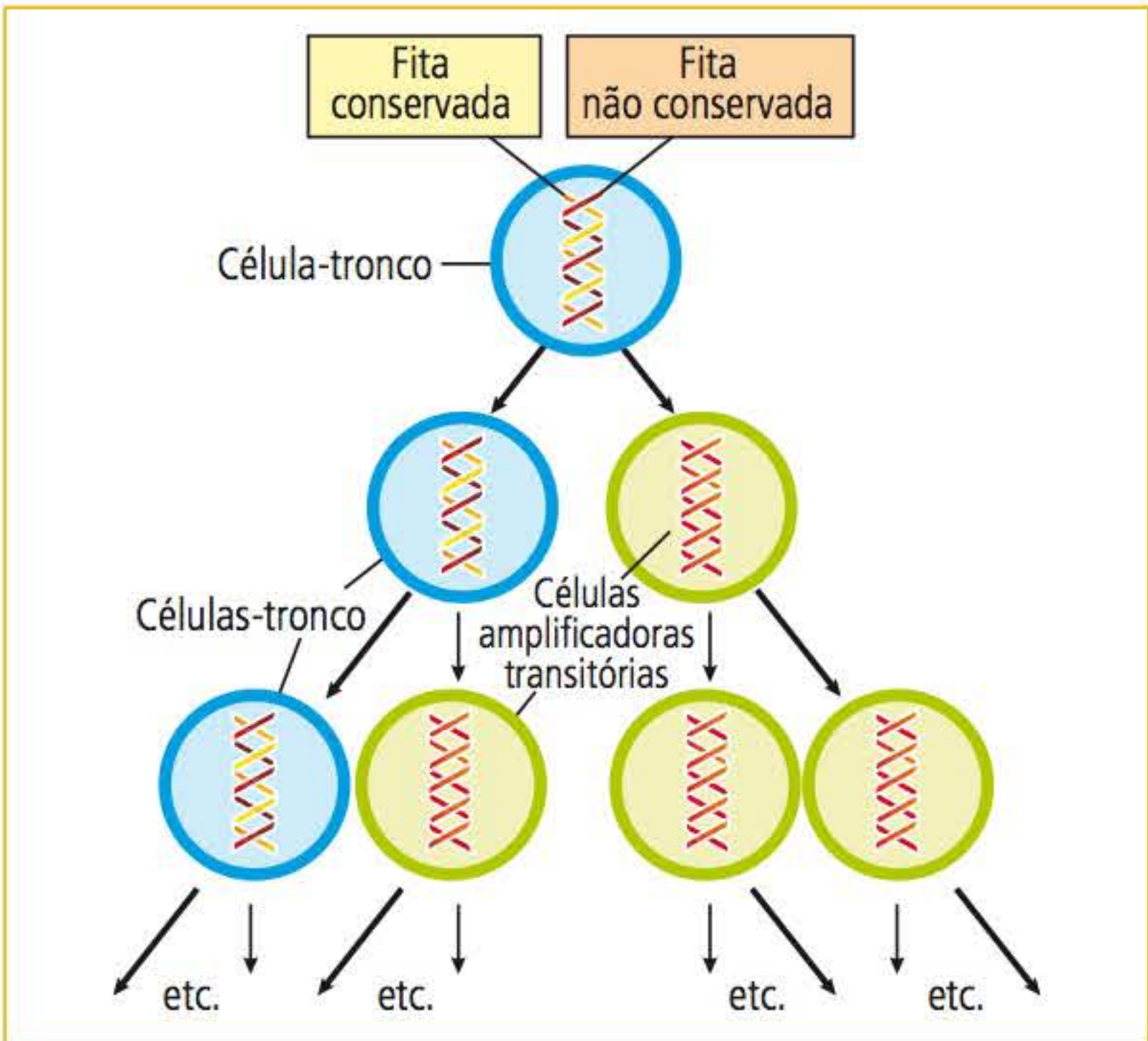
**FIGURA 11.2** Organização proliferativa, maturação e diferenciação de células-tronco. (A) Compartimento de células-tronco. (B) Células amplificadoras transitórias. Mitoses frequentes. (C) Células pós-mitóticas altamente diferenciadas. Exposição a agentes mutagênicos. (D) Morte celular. (E) Processo assimétrico de divisão de células-tronco, onde uma célula-filha se diferencia e a outra retorna para repor a célula-mãe.

Fonte: Adaptada de Weinberg.<sup>1</sup>

A análise de diversos tipos de leucemias corroborou para o entendimento de que os alvos



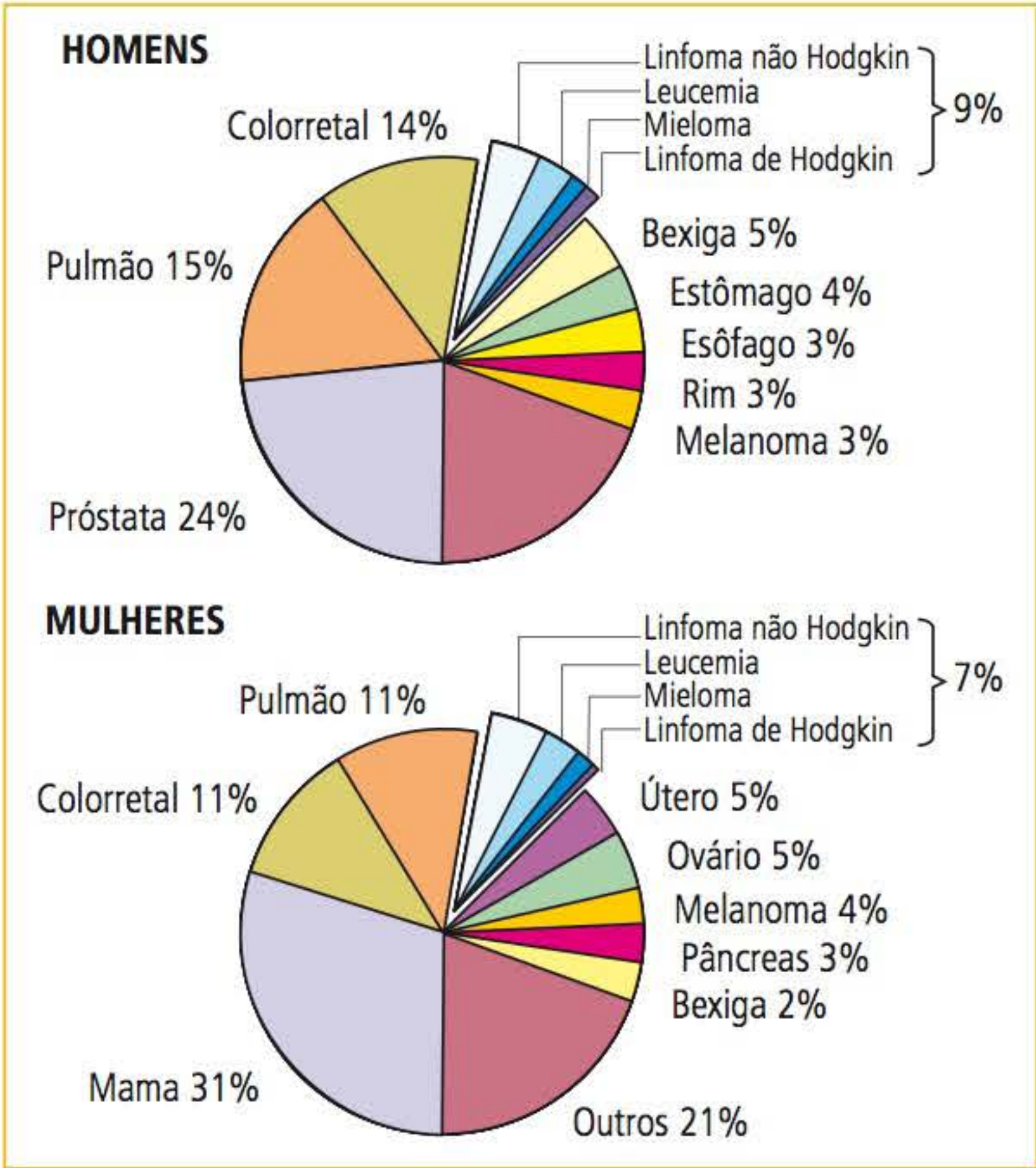
principais da carcinogênese nos tecidos são as células-tronco. Esse fato foi exaustivamente demonstrado, principalmente na leucemia mieloide crônica (LMC) que, em 95% dos casos, a causa é a translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, t(9:22)(q34;q11), também denominado de cromossomo Filadélfia (Ph1). Essa mutação está presente tanto nas células da linhagem mieloide quanto nas células das demais linhagens (precursores eritroides, plaquetários e em linfócitos T e B). Essas várias linhas de evidências convergem para a conclusão de que as células com capacidade de autorrenovação são os principais alvos para as mutações gênicas e que poderão, mais tarde, levar à formação de tumores. Podem ser tanto células-tronco com capacidade ilimitada de autorrenovação ou células progenitoras já comprometidas e com capacidade de autorrenovação limitada. Esses tipos celulares são os mais comuns na hematopoiese. Outro fator importante dentro desse entendimento de prevenção de acúmulos de danos genéticos nas células-tronco e tumorigênese é a alocação assimétrica da fita de DNA, pois as células-filhas que permanecerão como células-tronco mantêm a fita de DNA conservada, ao passo que aquelas células-filhas que entrarão nas vias de diferenciação terão como genoma as fitas de DNA não conservadas<sup>1</sup> (Figura 11.3).



**FIGURA 11.3** Mecanismo de conservação da fita de DNA em células-tronco (em azul), as quais permanecerão nesse compartimento. Observar a fita de DNA não conservada nas células-filhas (células amplificadoras transitórias) que evoluirão para diferenciação (em verde).

Fonte: Weinberg.<sup>1</sup>

Em relação às neoplasias malignas hematológicas, essas são doenças clonais que se originam de uma única célula mutada na medula óssea ou no tecido linfóide periférico. Representam aproximadamente 7 a 9% das doenças malignas, cujos aspectos genéticos, geográficos e ambientais são fatores determinantes para sua ocorrência (Figura 11.4). Polimorfismos ou fatores herdados presentes em algumas doenças genéticas, como síndrome de Down, ataxia-teleangiectasia e anemia de Fanconi, entre outras, aumentam potencialmente a possibilidade de desenvolvimento de leucemias. Entre os fatores ambientais, a exposição a agentes químicos, incluindo fármacos e radiação ionizante, é considerada a principal causa de neoplasias hematológicas. O caráter leucemogênico das radiações ionizantes foi evidenciado, de forma inequívoca, após a Segunda Guerra Mundial, pela elevada incidência de todos os tipos de leucemias, exceto a leucemia linfocítica crônica (LLC), nos sobreviventes das cidades de Hiroshima e Nagasaki, após a explosão das bombas atômicas.



**FIGURA 11.4** Relação das neoplasias hematológicas com as demais neoplasias.

Fonte: Smith e colaboradores.<sup>6</sup>

**ASPECTOS GENÉTICOS, MOLECULARES E MORFOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS HUMANAS**

Embora se saiba que a base da implantação e do desenvolvimento das neoplasias hematológicas

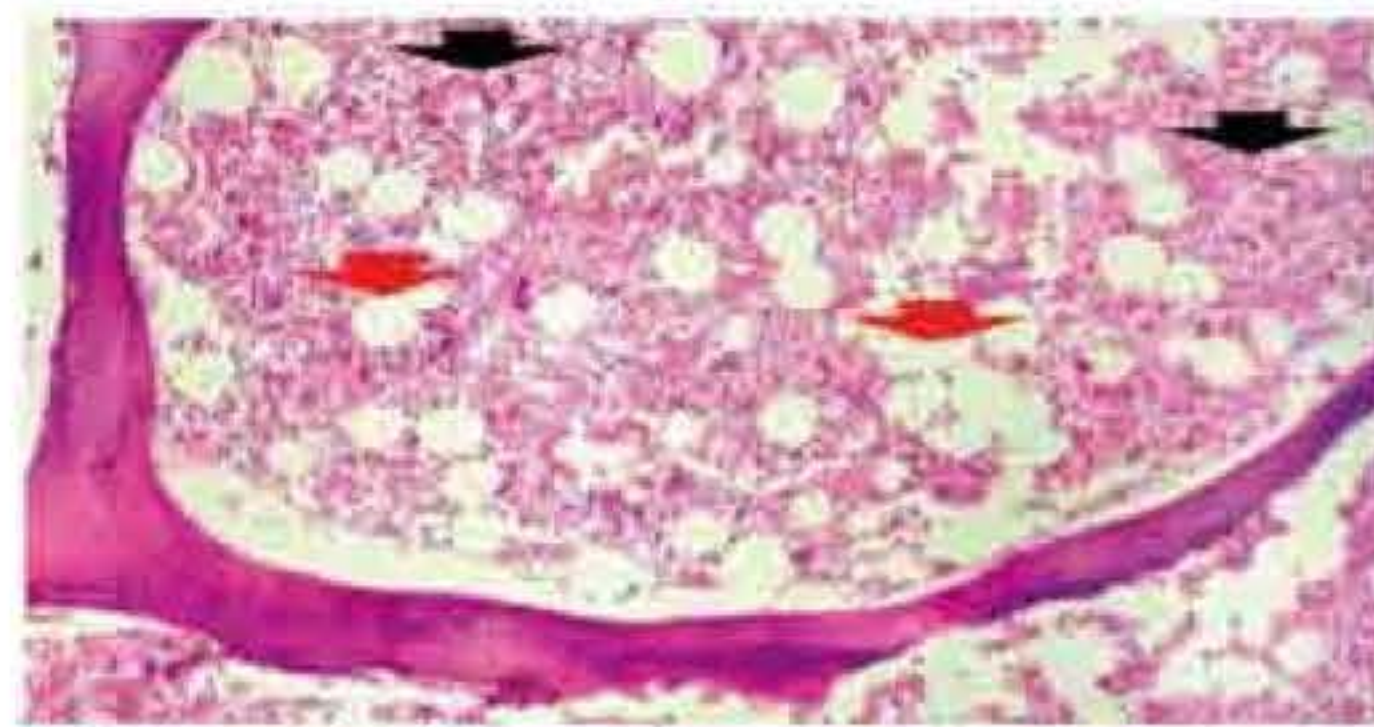


seja a medula óssea, é importante salientar que os primeiros sinais e evidências desse grupo de patologias são observados, rotineiramente, no hemograma, ou seja, na avaliação hematológica do sangue periférico e não diretamente no exame da medula óssea. Isso demonstra de forma inequívoca a importância do hemograma na prática clínica diária e, por consequência, o papel insubstituível do laboratório clínico nessa abordagem.

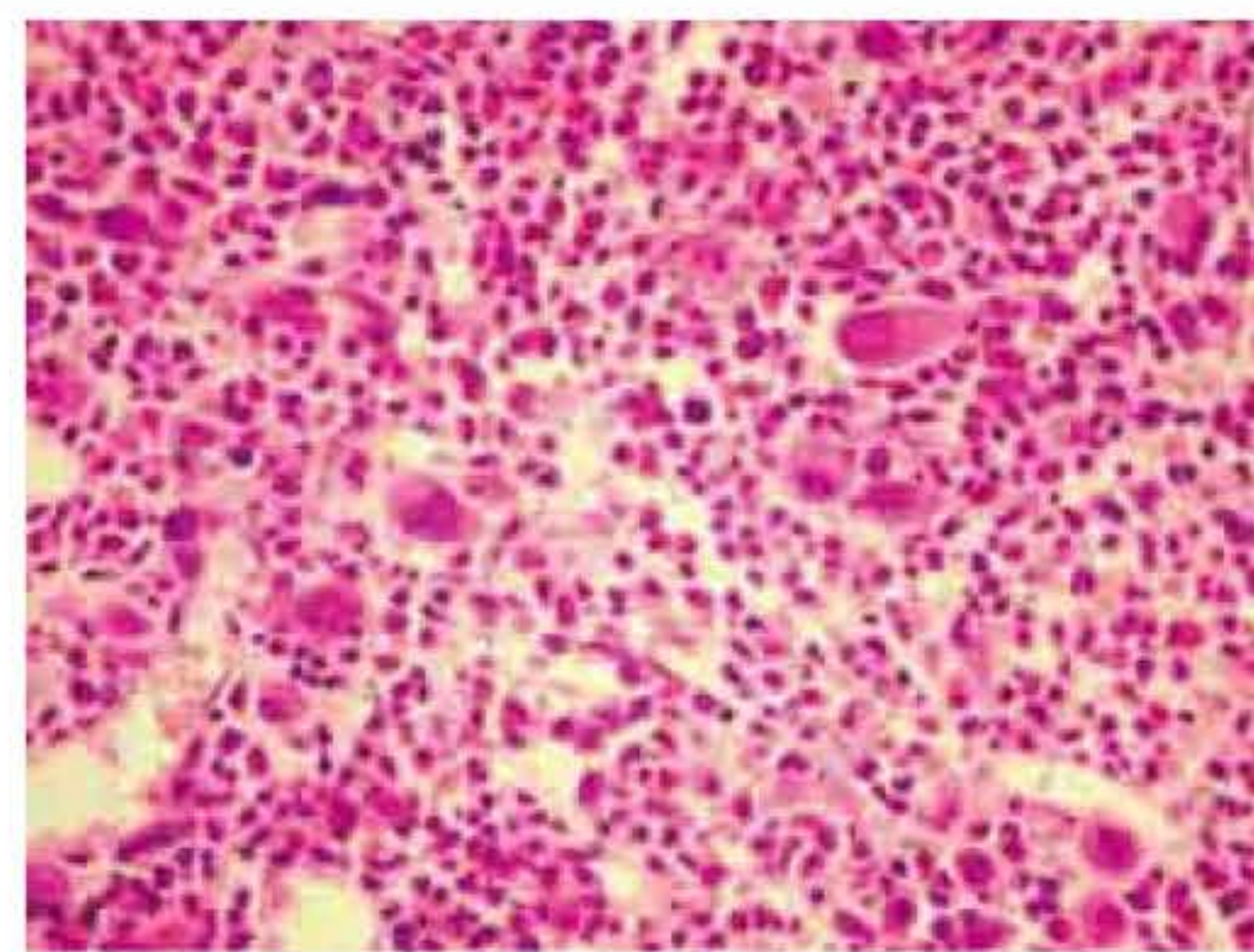
Por ser o sangue periférico um reflexo direto do *status* em que a medula óssea se encontra, quanto à quantidade e ao predomínio de células hematopoiéticas, o conhecimento adequado da composição, do predomínio celular e da relação quantitativa entre as células sanguíneas na medula óssea são conhecimentos fundamentais e necessários para a interpretação e o entendimento dessas alterações e sua correlação com as neoplasias hematológicas, bem como para o diagnóstico diferencial de situações benignas ou simplesmente reativas.

Levando-se em consideração a análise da composição da medula óssea, duas informações são importantes: a primeira delas é o estado comparativo entre a quantidade de tecido hematopoiético e o tecido de sustentação (tecido conectivo e principalmente tecido adiposo) e a segunda é a distribuição e prevalência entre as células hematopoiéticas. Quando se compara a quantidade de tecido hematopoiético e tecido gorduroso em uma medula óssea normal, deve existir um equilíbrio entre ambos, ou seja, uma relação aproximadamente de 1:1 (50% tecido hematopoiético: 50% tecido gorduroso), caracterizando uma situação denominada de medula óssea normocelular/normoplásica (**Figura 11.5**). Em situações de doenças neoplásicas, desvios dessa relação estarão presentes, estabelecendo, na grande maioria das vezes, o possível diagnóstico, como nas neoplasias mieloproliferativas (NMP) e nas leucemias, quando ocorrerá um predomínio, embora variável, do tecido hematopoiético, caracterizando uma hiper celularidade das células sanguíneas e determinando o que se chama de medula óssea hiper celular ou hiperplásica (**Figura 11.6**). Uma diminuição do tecido hematopoiético ou aumento, principalmente do tecido conectivo/adiposo, determina uma medula óssea hipocelular ou hipoplásica (**Figura 11.7**), a qual está associada normalmente a doenças com déficit de produção de células sanguíneas, quer por deficiência direta de produção, tratamento por quimioterapia ou invasão da

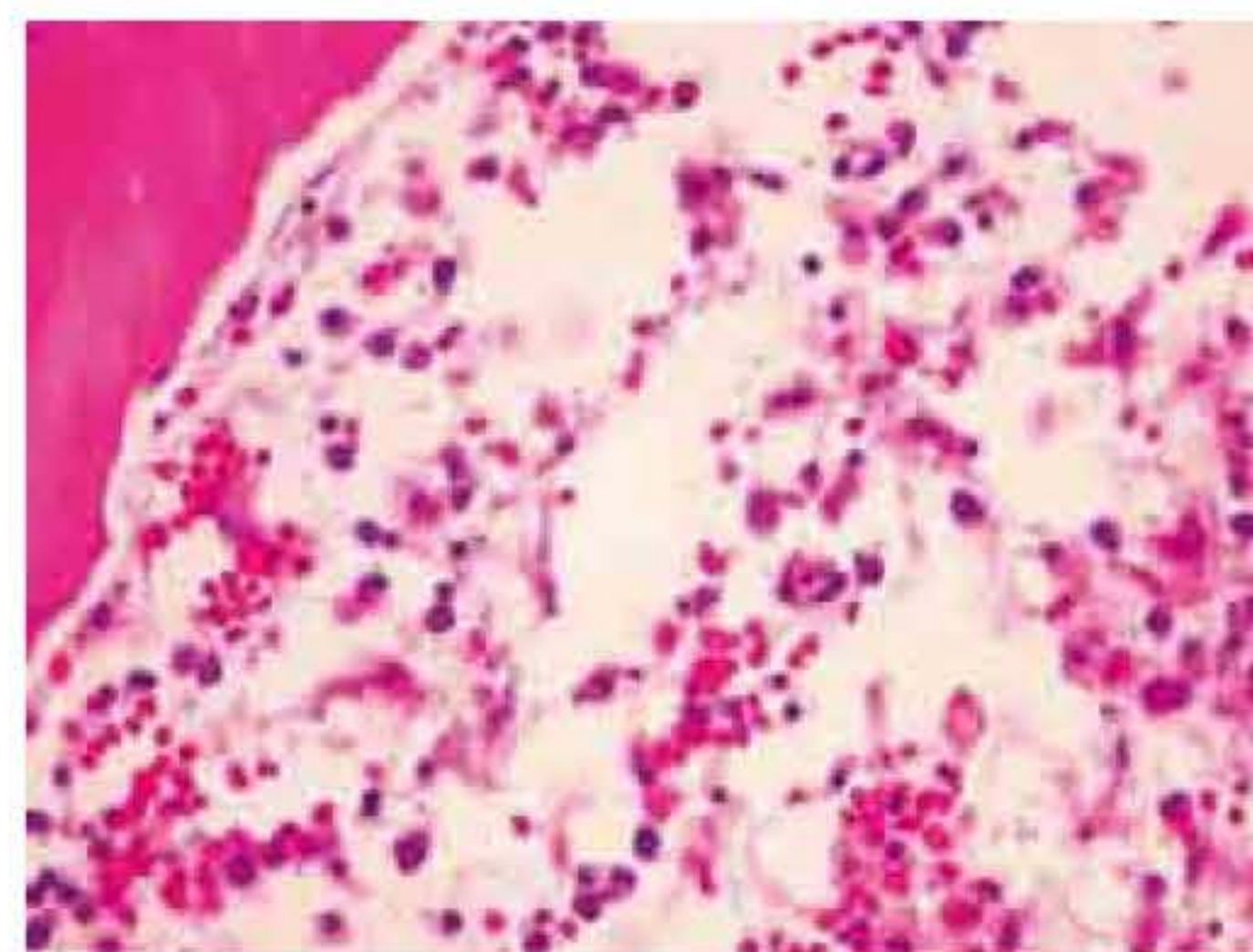
medula óssea por outras neoplasias de origem não hematológica, como metástases ósseas causadas por tumores sólidos.



**FIGURA 11.5** Medula óssea normocelular. Observar a distribuição homogênea e equitativa entre o tecido hematopoiético (seta preta) e o tecido adiposo (seta vermelha). Biópsia de medula óssea. (Coloração Hematoxilina-Eosina [HE])



**FIGURA 11.6** Predomínio evidente de células hematopoiéticas. Raras células adiposas presentes. Biópsia de medula óssea. (Coloração HE)



**FIGURA 11.7** Medula óssea hipocelular. Observar o predomínio de tecido conectivo, com pouco tecido hematopoiético. Biópsia de medula óssea. (Coloração HE)

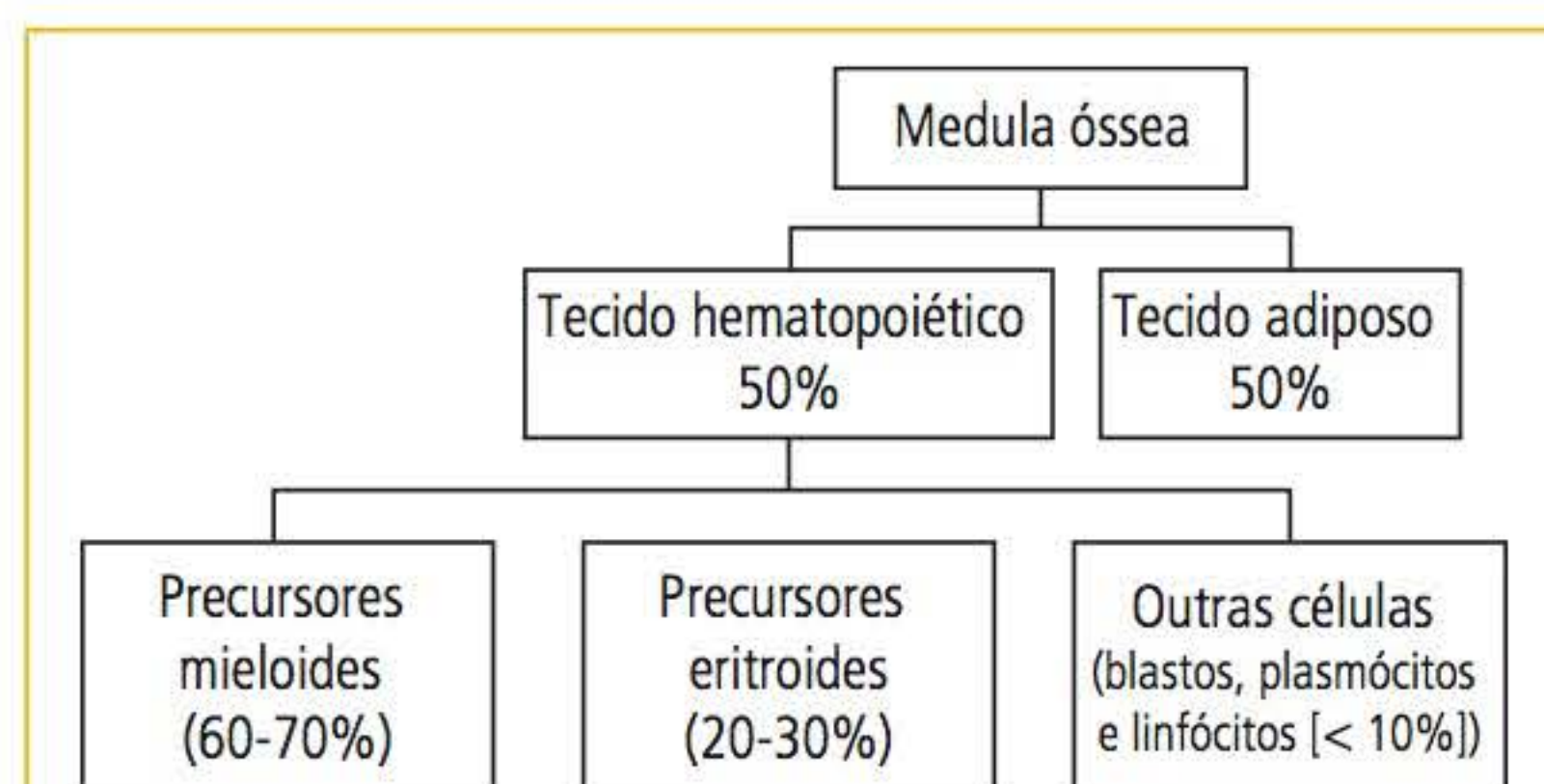


No entanto, a análise da distribuição e da prevalência celular possui uma relação mais direta e específica na identificação da causa ou da doença propriamente dita, pois demonstra, de forma individual e comparativa, as linhagens celulares presentes e prevalentes, bem como o desaparecimento de alguma linhagem, caso seja essa a situação. Dessa forma, em uma medula óssea normal e entre as células sanguíneas nucleadas, considerando-se as três linhagens (eritroide, leucocitária e plaquetária) e todas as fases de maturação e diferenciação, há um predomínio de precursores mieloides ou granulocíticos (principalmente neutrófilos – pró-mielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes, segmentados – também predominando entre essas células as mais maduras) em torno de 60 a 70% do total. Em segundo lugar, aparecem os precursores eritroides nucleados (pró-eritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos ortocromáticos/picnóticos) em um percentual em torno de 20 a 30%. Em terceiro lugar, com aproximadamente 10% do total, aparecem as demais células e não nominadas anteriormente, tais como blastos, linfócitos, plasmócitos e monócitos (**Figura 11.8**). Observando-se a prevalência celular descrita anteriormente, pode-se estabelecer que as principais células que compõem quantitativamente a medula óssea são os precursores mieloides (principalmente os neutrófilos) e os precursores eritroides (eritroblastos) em uma proporção que varia, aproximadamente, de 1:2,5 até 1:5. A presença de variações tanto para a direita quanto para a esquerda determina associações específicas com doenças neoplásicas hematológicas ou não, que comprometem a medula óssea. Nas NMPs, haverá um aumento da relação para a direita, e o tipo de célula envolvido determinará a doença em questão. Nas anemias hemolíticas em que o desvio para a esquerda está presente,

poderá haver uma inversão da relação. Ainda seguindo esse raciocínio lógico, o aumento do percentual de outras células, como linfócitos, blastos e plasmócitos, está relacionado com leucemia linfocítica crônica (LLC), aguda e mieloma múltiplo, respectivamente.

A etiologia e apresentações clínica e laboratorial das hemopatias malignas são muito heterogêneas, determinando situações diversas de achados no diagnóstico, tratamento e prognóstico. Para uma facilitação do entendimento da origem, da apresentação e do comportamento dessas doenças, faz-se necessária uma classificação. As classificações mais aceitas são aquelas que se baseiam nos critérios utilizados pela Revised European-American Lymphoma Classification (REAL) para as neoplasias linfoides; pelo grupo de cooperação franco-americano-britânico, denominada de classificação FAB (French-American-British Cooperative Group Classification) para as leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas (SMD) e o *guideline* utilizado pelo Grupo de Estudos para Policitemia Vera (Polycythemia Vera Study Group – PVSG) para as neoplasias mieloproliferativas.

Em 2008, baseado nos estudos de revisão de 2001-2002, 3ª e 4ª edições, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em colaboração com a Society for Hemopathology e com a European Association of Haemopathology, publicou a Classificação de Tumores Hematopoiéticos e do Tecido Linfoide.<sup>7</sup> Constitutivamente, a nova classificação ainda sustenta achados morfológicos e a contagem de blastos leucêmicos no sangue periférico e na medula óssea acima de 20%; no entanto, com o acréscimo de provas citoquímicas, imunofenotipagem, citogenética e apresentação clínica. A preocupação pela percepção inequívoca da presença e da contagem de blastos desencadeou, na prática, a observação de critérios claros com relação à identificação e descrição de quais seriam verdadeiramente essas células que entrariam na contagem, tendo em vista a necessidade de reprodutibilidade morfológica e conceitual. Para esse fim, foram levados em consideração os critérios propostos recentemente pela International Working Group on Morphology and Myelodysplastic Syndrome (IWGMMS),<sup>5,6</sup> em que alguns dos critérios utilizados diferem dos já conhecidos e utilizados em classificações anteriores. Conforme as recomendações da IWGMMS, os critérios propostos para a contagem e classificação do grau de maturação das células blásticas devem ser realizados utilizando-se a coloração Wright-



**FIGURA 11.8** Distribuição e prevalência das células do sangue na medula óssea.



-Giemsa ou May-Grünwald Giemsa, e a contagem de 200 e 500 células (leucócitos) para o sangue periférico e a medula óssea, respectivamente. Serão considerados blastos, em adição aos mieloblastos: monoblastos, pró-monócitos, megacarioblastos e pró-mielócitos leucêmicos da leucemia pró-mielocítica aguda, esses últimos caracterizados morfológicamente como uma célula mais madura com núcleo reniforme ou lobulado, citoplasma intensamente granular ou, às vezes, agranular, porém com a presença de feixes de bastonetes de Auer. Estão excluídos os precursores eritroides (eritroblastos), exceto nos raros casos de eritroleucemia pura e megacariócitos displásicos.<sup>6,8</sup>

Pode-se também utilizar como valor agregado no diagnóstico e prognóstico, por meio da imunofenotipagem, a presença e quantificação de células que expressam CD34 (CD34+). Entretanto, isso não substitui a avaliação e contagem morfológica direta, pelo fato de que, embora geralmente as células CD34+ sejam blastos, nem todas as células blásticas expressam esse marcador.<sup>6,8</sup>

A classificação determinada pela OMS inclui ainda as alterações citogenéticas específicas ou comuns, caracterizadas como subcategorias e que também estão diretamente associadas a diagnóstico, comportamento e prognóstico, quando disponíveis ou possíveis. Definem-se, então, dois grandes grupos de tumores, aqueles de origem mieloide e aqueles de origem linfoide, tendo cada um os seus subgrupos classificados de modo específico.<sup>6,8</sup>

CITOQUÍMICA, CITOGENÉTICA E IMUNOFENOTIPAGEM

Por muito tempo, o diagnóstico das leucemias foi feito apenas pela observação das células do sangue periférico (hemograma) e da medula óssea (mielograma). O problema do hemograma e do mielograma é que a morfologia, como um único parâmetro, não é suficiente para determinar todos os tipos de leucemias existentes atualmente. Mesmo assim, ainda hoje, o hemograma continua sendo uma ferramenta muito importante na identificação primária dessas doenças e, na maioria das vezes, é o primeiro instrumento a detectar os quadros leucêmicos, podendo informar, inclusive, a característica crônica ou aguda da doença. No primeiro caso (leucemias crônicas), também ainda é possível determinar o tipo celular envolvido, mieloide ou linfoide.

Muitas vezes, o diagnóstico é ao acaso, identificado em exames realizados de rotina e sem qualquer sintomatologia ou percepção inicial da doença.

O exame da medula óssea, por aspirado (mielograma) ou biópsia, possui caráter decisivo no diagnóstico definitivo, pois, além das informações próprias de cada uma dessas modalidades de exame, permite a avaliação citoquímica, citogenética e imunofenotípica das células neoplásicas.

CITOQUÍMICA

As provas citoquímicas surgiram como os primeiros exames complementares no auxílio da identificação de linhagem celular e, portanto, na classificação das leucemias, principalmente as agudas. As provas mais utilizadas e padronizadas para esse fim foram a Mieloperoxidase (MPO), Sudan Black (SB), Ácido Periódico de Schiff (PAS, do inglês – Periodic Acid-Schiff), esterases específicas e não específicas (EE/ENE).<sup>9</sup>

A mieloperoxidase está presente nos grânulos primários dos precursores dos neutrófilos, nos grânulos azurrófilos dos monócitos e nas granações secundárias dos eosinófilos. A reação é positiva em blastos de origem mieloide com alguma evidência de maturação, em pró-mielócitos e em mielócitos; nos metamielócitos e neutrófilos, a reação positiva é fraca devido ao aumento dos grânulos secundários. Os monoblastos e monócitos podem apresentar uma reação positiva fraca ou negativa. A MPO é importante para a caracterização do mieloblasto, e uma prova positiva faz diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA). A prova citoquímica do SB tem a mesma interpretação que a MPO, com a diferença de ser menos específica e que em 1,6% dos casos de leucemia linfocítica aguda (LLA) a coloração é positiva.<sup>9</sup> A Tabela 11.2 mostra o resultado das provas de MPO e SB na LMA, segundo a classificação FAB.

TABELA 11.2 Resultado das provas de MPO e SB nas LMAs, segundo a classificação FAB	
CLASSIFICAÇÃO FAB	RESULTADO MPO E SB
M0	Menos de 3% dos blastos são positivos <sup>1</sup>
M1	Entre 3-100% dos blastos são positivos <sup>1</sup>
M2	Entre 3-100% dos blastos são positivos <sup>1</sup>
M3	Positividade intensa <sup>1</sup>
M4	Entre 3-100% dos blastos são positivos, com padrão de coloração localizado, padrão disseminado nos monoblastos e monócitos <sup>1</sup>
M5	Podem ser negativas nos blastos e monócitos <sup>1</sup>
M6	Alguns blastos mieloides são positivos <sup>1</sup>
M7	Os blastos mieloides podem ser positivos <sup>1</sup>



As esterases são enzimas encontradas nos leucócitos, sendo conhecidas nove isoenzimas, divididas em esterases específicas e não específicas. As específicas são encontradas nos granulócitos, são os subtipos 1, 2, 7, 8 e 9 e coram-se especificamente com naftol AS-D cloroacetato esterase (CAE). As não específicas são as isoenzimas dos subtipos 3, 4, 5, e 6, coram-se com  $\alpha$ -naftilacetatoesterase (ANAE) e  $\alpha$ -naftilbutirato esterase (ANBE).<sup>9,10</sup> A **Tabela 11.3** mostra o resultado das provas de esterases específicas e não específicas nas LMAs, segundo a classificação FAB.

TABELA 11.3 Resultado das provas de esterases específicas e não específicas nas LMAs, segundo a classificação FAB	
CLASSIFICAÇÃO FAB	RESULTADOS DAS PROVAS CITOQUÍMICAS DA ESTERASE
M0	Esterases negativas <sup>1</sup>
M1	Menos de 10% dos blastos são positivos para CAE, raramente são positivos para ANAE e ANBE <sup>1</sup>
M2	Mais de 10% das células são positivas para CAE, raramente são positivas para ANAE e ANBE <sup>1</sup>
M3	A maioria das células é positiva para CAE <sup>1</sup>
M4	Mais de 20% das células são positivas para ANAE e ANBE <sup>1</sup>
M5	Mais de 80% das células são positivas para ANAE e ANBE <sup>1</sup>

⚡ CITOGENÉTICA

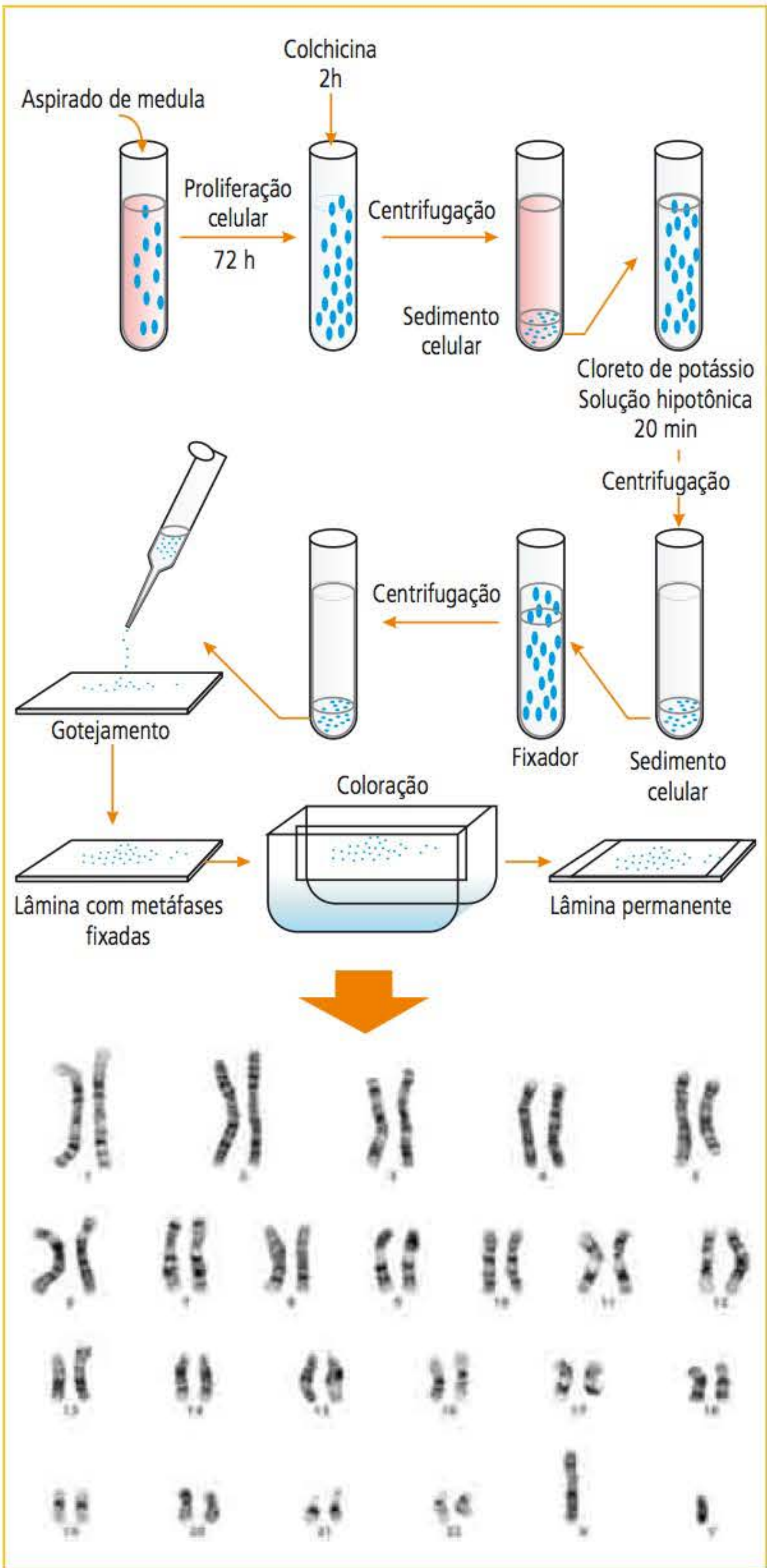
A citogenética tem como objetivo o estudo das alterações cromossômicas nas células transformadas, contribuindo, principalmente, com o prognóstico da neoplasia, a classificação e, de forma contundente, a verificação de remissão completa ou parcial e de doença residual mínima (DRM) nos pacientes em tratamento. O melhor material biológico para esse fim é o aspirado de medula óssea, podendo, no entanto, ser utilizado também o sangue periférico, desde que o número de blastos circulantes seja adequado (superior a pelo menos 10% das células).<sup>11</sup>

O exame citogenético pode ser realizado por meio de análise direta das células ou por meio de cultura celular. Independentemente da forma utilizada, o aspirado de medula óssea ou de sangue periférico deve ser colocado em meio RPMI 1640 ou em meio *MacCoy's*, suplementado com soro fetal bovino, L-glutamina, penicilina e estreptomicina.<sup>9,11</sup> Na preparação direta, as células são colocadas no meio de cultura contendo colchicina e, após 1 hora de cultivo, são retiradas. A finalidade da colchicina é inibir a formação do fuso mitótico,

fazendo com que as células parem a divisão na fase da metáfase. Pelo fato de as células já estarem em divisão, o método direto traduz maior rapidez na cariotipagem, porém, com a desvantagem de exibir menor quantidade de metáfases, tornando mais difícil, muitas vezes, a identificação de alterações cromossômicas.<sup>11</sup> Já o método indireto permite um maior número de células em metáfase, levando em conta que as células aspiradas são cultivadas por um período maior, que varia entre 24 e 72 horas. Outra vantagem desse método é a possibilidade da sincronização da divisão celular, deixando praticamente todas as células em um mesmo estágio de divisão e alongamento dos cromossomos, elevando a sensibilidade na detecção de pequenas deleções ou translocações. Para que a sincronização seja possível, deve ser adicionado ao meio um bloqueador de timina, levando as células a permanecerem na fase S do ciclo celular por um período aproximado de 17 horas. Após esse tempo, adiciona-se timina ao meio, permitindo, dessa forma, o reinício e a progressão do ciclo.<sup>11</sup> O passo seguinte do processo de análise citogenética é o tratamento com solução hipotônica de KCl (0,075M), com a finalidade de espalhar os cromossomos no interior da célula. Então, as células são fixadas com uma solução de metanol/ácido acético (proporção de 1:1) e colocadas em uma lâmina para microscopia. Após a coloração de banda G, as metáfases podem ser analisadas por microscopia (**Figura 11.9**).

Em termos citogenéticos, um clone é definido como tal quando pelo menos duas metáfases analisadas apresentam a mesma alteração estrutural ou hiperploidia ou quando pelo menos três metáfases apresentam a mesma hipoploidia.<sup>11</sup> As alterações cromossômicas podem ainda ser classificadas em primárias ou secundárias. As primárias são aquelas que dão origem ou estão frequentemente associadas às hemopatias malignas, por exemplo, a t(9q;22q) na LMC. Por outro lado, as alterações secundárias estão correlacionadas normalmente com o prognóstico, por exemplo, resposta a um tratamento instituído, quanto à remissão (completa, parcial ou sem remissão), resposta a um transplante de medula óssea ou ainda evolução da neoplasia para uma fase mais avançada. Um exemplo dessa última situação é a LMC em fase acelerada ou crise blástica, quando, com frequência, ocorrem novas mutações ou subclones malignos (nesses casos, representados pela trissomia nos cromossomos 8 ou 19 e a presença de mais de um Ph1), os quais estão associados a um prognóstico ruim ou reservado.



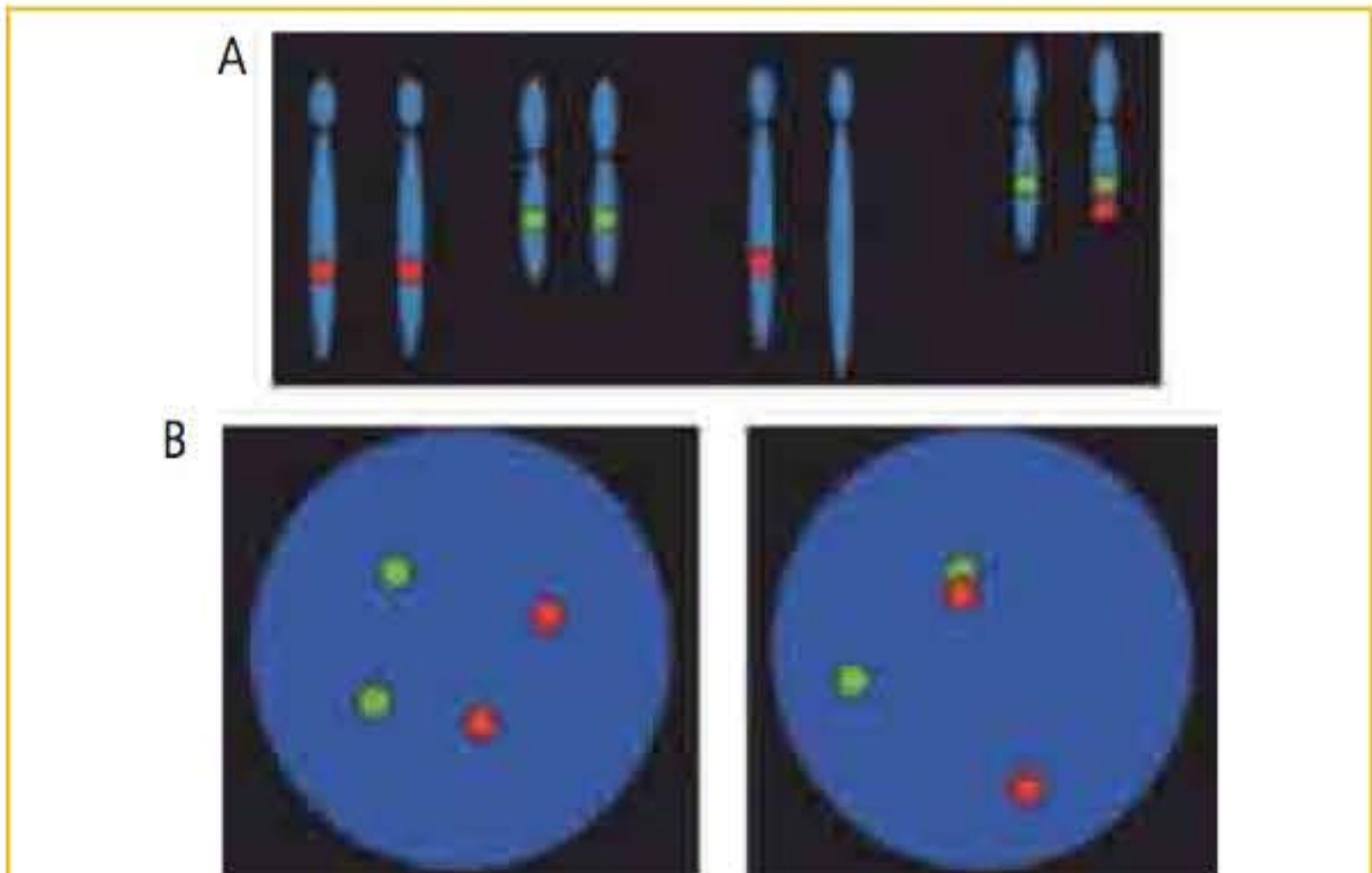


**FIGURA 11.9** Técnica para identificação de cariótipo por meio de cultura de células e cromossomos metafásicos.

Em algumas hemopatias malignas, principalmente aquelas de crescimento lento, como na leucemia linfocítica crônica (LLC), a análise citogenética pode ser dificultada pela pouca presença e qualidade de metáfases.

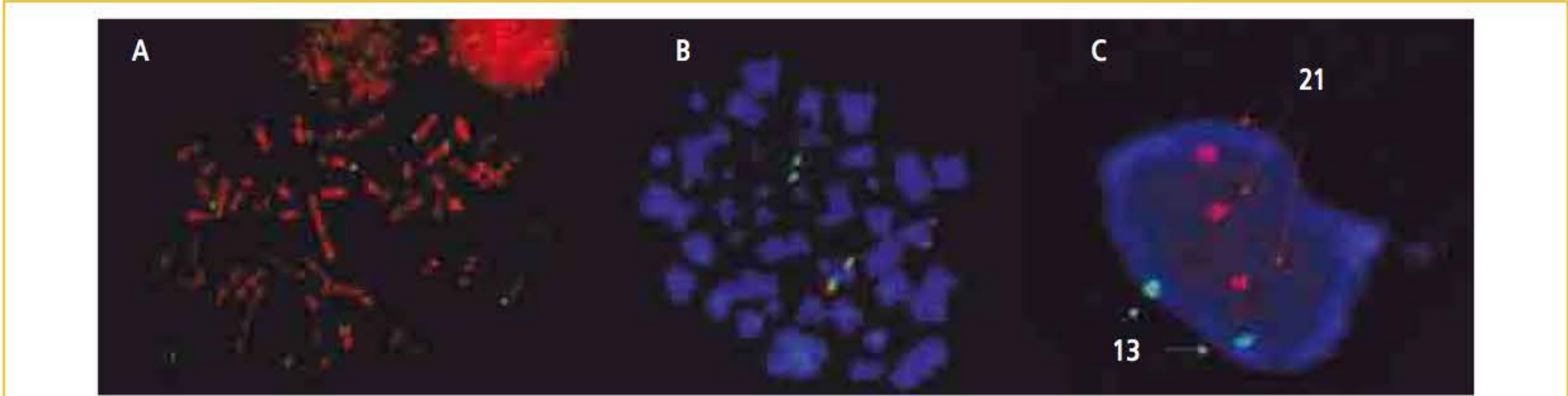
Embora a execução de um exame citogenético convencional possa ser considerado, muitas vezes, demorado nos casos das leucemias agudas, pelas características de evolução rápida desse tipo de neoplasia, o seu uso como valor prognóstico é de extrema importância.

Com o advento da biologia molecular, a citogenética tomou novos rumos, melhorando de forma indiscutível a detecção de anomalias cromossômicas com base na utilização de sondas moleculares, que são sequências conhecidas de ácidos nucleicos e que têm como objetivo identificar a sequência complementar nos cromossomos em estudo, tanto em cromossomos em metáfase, quanto na interfase.<sup>12,13</sup> A reação é revelada pela utilização de fluorocromos ligados a essas sondas e observada por microscopia de fluorescência, técnica conhecida como FISH (*fluorescence in situ hybridization*)<sup>12</sup> (Figuras 11.10 e 11.11).



**FIGURA 11.10** (A) FISH em cromossomos metafásicos e (B) em cromossomos em interfase.

Fonte: Sagrillo e colaboradores.<sup>14</sup>



**FIGURA 11.11** (A) FISH – cromossomos em metáfase e interfase. (B) FISH – cromossomos em interfase demonstrando cromossomo 3 com a fusão PML/RARα e (C) trissomia do cromossomo 21, Síndrome de Down (C).

Fonte: Chauffaille<sup>15</sup> e UW Medicine Pathology.<sup>16</sup>



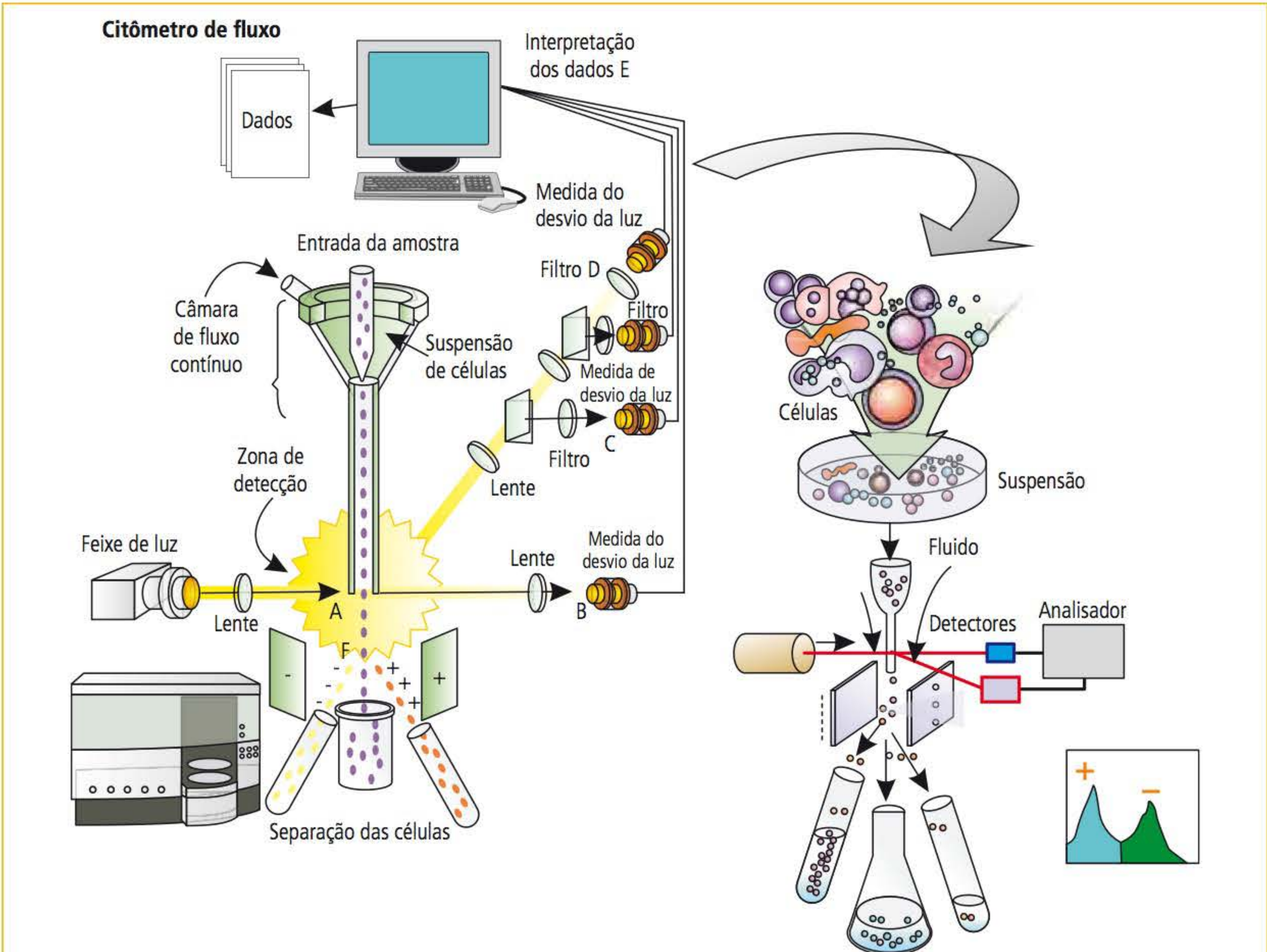
IMUNOFENOTIPAGEM

Caracteriza-se por imunofenotipagem a identificação de antígenos celulares específicos associados à linhagem e ao grau de maturação e diferenciação das células sanguíneas. Para esse fim, são utilizados anticorpos monoclonais conjugados com agentes fluorescentes (fluorocromos), em que a reação é medida em citômetro de fluxo.<sup>17,18</sup> Por permitir a identificação individual das células do sangue, a tecnologia da citometria de fluxo vem sendo incorporada cada vez mais na prática laboratorial em hematologia, principalmente na identificação e classificação das hemopatias, bem como nos analisadores hematológicos para a determinação da contagem diferencial celular, contagem de reticulócitos, concentração de hemoglobina nos reticulócitos (Ret-He/CHr) e índice de plaquetas reticuladas (IPR), entre outros.

A citometria de fluxo baseia-se na técnica do foco hidrodinâmico, em que células alinhadas umas atrás das outras, diluídas em um fluido

especial e em fluxo contínuo e constante, passam por um local onde incide um feixe de raio *laser* emitido em um determinado comprimento de onda (o mais utilizado é o argônio em 488nm), o qual excita os fluorocromos conjugados aos anticorpos e ligados aos sítios antigênicos pretendidos nas células sanguíneas do sangue periférico ou da medula óssea.<sup>17</sup> Com base no princípio de que cada fluorocromo utilizado possui uma energia de excitação máxima e mínima em um determinado comprimento de onda, as populações celulares podem ser reconhecidas e quantificadas. De forma complementar, os vários ângulos de desvio do feixe de luz incidente em cada célula também podem ser medidos e refletem, de forma direta, a relação entre o tamanho dessa célula e o seu grau de complexidade (presença e tipo de granulações no citoplasma, relação núcleo/citoplasma e número de lóbulos do núcleo)<sup>18</sup> (Figura 11.12).

A imunofenotipagem teve um avanço muito rápido com a epidemia causada pelo vírus HIV,



**FIGURA 11.12** Esquema de funcionamento de um citômetro de fluxo.

Fonte: Science Night Club.<sup>19</sup>



devido à grande necessidade de se identificar e quantificar linfócitos CD4+ e CD8+ no sangue periférico desses pacientes.<sup>18</sup> A partir desse fato, a transferência e aplicação desses conhecimentos na diferenciação e caracterização de neoplasias hematológicas foi um grande avanço, pois permitiu o reconhecimento, de uma maneira muito sensível e específica, dos vários tipos e subtipos dessas doenças (incluindo a relação do imunofenótipo com a causa citogenética) (**Tabela 11.4**) e de fatores prognósticos e o desenvolvimento de novos tratamentos como a imunoterapia, por exemplo. Possibilitou também uma readequação da classificação FAB para as leucemias mieloides agudas, incluindo, a partir de então, os tipos M0 (leucemia mieloide aguda com pouca diferenciação) e M7 (megacariocítica), além dos subtipos B e T, nas neoplasias linfocíticas agudas e crônicas.

O British Committee for Standards in Haematology<sup>23</sup> e o European Group for the Immunological Characterization of Leukaemias (EGIL)<sup>24</sup> propõem a utilização de painéis de anticorpos para o diagnóstico e a classificação das leucemias agudas.

A importância da imunofenotipagem, atualmente, não se restringe apenas à caracterização de linhagem e ao grau de maturação das células tumorais, mas relaciona-se de forma direta com as características clínicas de cada tipo específico e a detecção de doença residual mínima. Na aborda-

gem laboratorial desse exame, são realizados, primariamente, alguns marcadores preliminares, por exemplo, na diferenciação mieloide/linfoide, linfócito T/linfócito B e, posteriormente, são aplicados, de forma complementar, marcadores mais específicos (**Tabela 11.5**).

NEOPLASIAS MIELOIDES

O termo mieloide, segundo a OMS, inclui todas as células pertencentes à linhagem granulocítica (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monócitos/macrófagos, eritroide, megacariocítica e mastócitos. Os critérios iniciais para o diagnósticos estão baseados nos achados morfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos das células neoplásicas do sangue periférico e da medula óssea, os quais determinam a linhagem envolvida e a fase de maturação e diferenciação em que se encontram. O percentual de blastos no sangue periférico e na medula óssea permanece ainda como uma importante ferramenta para a avaliação de progressão da doença, seja para uma doença mielodisplásica/mieloproliferativa, seja mesmo para uma leucemia aguda.

Ainda segundo a classificação da OMS, as neoplasias mieloides incluem cinco subgrupos: 1) neoplasias mieloproliferativas (NMP); 2) síndromes mielodisplásicas (SMD); 3) síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas (MDS/NMP); 4) síndromes mieloides/linfoides com eosinofilia e anorma-

TABELA 11.4 Correlação entre imunofenotipagem e citogenética

CITOGENÉTICA	IMUNOFENOTIPAGEM	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
t(9;22)	CD19+, CD10+, CD34++, CD38-/+, CD13+	100%	> 90%
t(12;21)	CD19+, CD10++, CD20-/+, CD34+, CD45-/+, HLA-DR++	86%	100%
11q23	CD19-, CD10-, CD20-, CD34+, CD15+, CD65+, 7.1+	95%	85%

Fonte: Adaptada de De Zen e colaboradores,<sup>20</sup> Khalidi e colaboradores<sup>21</sup> e Tabernero e colaboradores.<sup>22</sup>

TABELA 11.5 Imunofenotipagem preliminar e complementar proposta pelo EGIL e British Committee for Standards in Haematology

	PRELIMINAR	COMPLEMENTAR
Linfoide B	CD10, CD19, CD20	CD5, CD10, CD11c, CD22, CD23, CD25, CD38, Ccd79a, CD103, FMC7, cyBcl-2, IgMc, KAPPA E LAMBDA
Linfoide T	CD2, CD3, CD7	CD1a, cCD3, CD4, CD5, CD8, CD45, CD45RA, CD45RO, TCRαβ, TCRγδ
NK	CD3, CD16, CD56	CD11b, CD38, CD57, TCRαβ, TCRγδ
Ativadas		CD25, CD38, HLA-DR
Mieloide	CD13, CD33, cMPO	CD11b, CD14, CD15, CD36, CD38, CD41, CD56, CD61, CD64, GPA
Células precursoras	CD34	CD117, nTdT, CD133



lidades envolvendo *PDGFRA* (receptor alfa de fator de crescimento derivado de plaquetas), *PDGFRB* (receptor beta de fator de crescimento derivado de plaquetas) ou *FGFR1* (receptor para fator de crescimento de fibroblastos 1) e 5) leucemias mieloides agudas (LMA) (**Quadro 11.1**).<sup>25</sup> Os receptores *PDGFRA*, *PDGFRB* e *FGFR1* são receptores de superfície celular, com domínio citoplasmático tirosinaquinase, envolvidos em importantes mecanismos regulatórios como proliferação, crescimento e diferenciação celular e, portanto, também envolvidos em inúmeras patologias, inclusive outras neoplasias de origem não hematológica.

QUADRO 11.1 Classificação das neoplasias mieloides
1. Neoplasias mieloproliferativas (NMP)
2. Síndromes mielodisplásicas (mielodisplasias) (SMD)
3. Síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP)
4. Síndromes mieloides/linfoides com eosinofilia
5. Leucemias mieloides Agudas (LMA)

Fonte: Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

O **Quadro 11.2** contempla um guia necessário para o uso da classificação OMS-2008 para as neoplasias mieloides.

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)

Esse grupo foi observado pela primeira vez por William Dameshek, em 1951, e denominado de síndromes mieloproliferativas, para descrever as semelhanças observadas entre algumas doenças hematológicas, como a policitemia vera (PV), leucemia mieloide crônica (LMC), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária ou idiopática (MFI), as quais apresentavam características semelhantes de expansão clonal, clínica e biológica.<sup>26</sup>

Hoje denominadas de neoplasias mieloproliferativas (NMP), pela classificação da OMS-2008,<sup>8</sup> comprometem geralmente células hematopoiéticas totipotentes e se caracterizam por apresentar, inicialmente, uma medula óssea do tipo hipercelular, com hematopoiese eficaz, ausência de dispoiese e predomínio de precursores mieloides, eritroides ou plaquetários. Pode estar aumentada apenas uma das linhagens, duas ou as três, podendo também predominar uma sobre a outra. No sangue periférico (hemograma), observa-se um reflexo direto da medula óssea, ou seja, as mesmas características de predominância celular. O(s) tipo(s)

QUADRO 11.2 Roteiro para uso da classificação para neoplasias mieloides
GUIA DE UTILIZAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO OMS REVISADA PARA AS NEOPLASIAS MIELOIDES
<b>Amostras necessárias</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Coleta prévia de amostras de sangue periférico e medula óssea antes de qualquer terapia definitiva</li><li>▪ Análise do esfregaço do sangue periférico e da medula óssea, corados com Wright-Giemsa ou similar</li><li>▪ Biópsia de medula óssea se possível</li><li>▪ Estudo citogenético, imunofenótipo, biologia molecular de medula óssea inicial e após tratamento</li></ul>
<b>Avaliação de blastos</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Determinação da contagem de blastos por análise visual</li><li>▪ Mieloblastos, monoblastos, pró-monócitos, megacarioblastos e pró-mielócitos na LPA devem ser considerados (não incluir pró-eritroblastos, exceto na eritroleucemia pura aguda e megacariócitos displásicos)</li><li>▪ Contagem de CD34 por citometria de fluxo não substitui avaliação visual dos blastos. Nem todos os blastos são CD34+, e hemodiluição e outros artefatos podem mostrar um resultado equivocado ou errôneo</li><li>▪ Aspirado de medula óssea pobre ou presença de mielofibrose, imuno-histoquímica para CD34 em biópsia pode ser relevante para a identificação de blastos</li></ul>
<b>Análise da linhagem blástica</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Painel para imunofenotipagem por citometria de fluxo é recomendado</li><li>▪ Citoquímica: mieloperoxidase e esterase não específica podem auxiliar, principalmente nas LMAs, NOS (do inglês <i>not otherwise specified</i>)</li><li>▪ Análise de antígenos específicos de reconhecimento de linhagem mieloide e linfoide por imuno-histoquímica em material de biópsia</li></ul>
<b>Análise de anormalidades genéticas</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Estudo citogenético completo de aspirado de medula óssea ao diagnóstico, se possível</li><li>▪ Estudos adicionais por FISH ou RT-PCR para análise da presença de novas mutações, para informação prognóstica</li><li>▪ Pesquisa de mutações nos genes <i>NPM1</i>, <i>CEBPA</i> e <i>FLT3</i> nos casos de LMA com citogenética normal; <i>JAK2</i> nos casos de neoplasias mieloproliferativas <i>BCR-ABL1</i>-negativo; <i>KIT</i>, <i>NRAS</i>, <i>PTNP11</i>, outros</li></ul>
<b>Correlação das informações reportadas</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ OMS classificação</li></ul>

Fonte: Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>



celular(es) envolvido(s) determina(m) a doença específica. Clinicamente, apresentam-se, inicialmente, como doença crônica, podendo, ao longo do tempo, evoluir para uma falência medular com fibrose ou ainda para leucemia aguda. São manifestações clínicas comuns às NMPs, hematopoiese extramedular, esplenomegalia e alto risco de hemorragia (embora esses pacientes apresentem normalmente trombocitose intensa, muitas vezes superior a 1.000.000/ $\mu$ L) e trombose.<sup>27</sup>

A OMS, na revisão de 2008,<sup>8</sup> colocou em primeiro plano classificatório para esse grupo de neoplasias um critério citogenético, a presença ou ausência da fusão *BCR-ABL*, também denominada de cromossomo Filadelfia (Ph1), acrescentado aos achados morfológicos previamente encontrados (Quadro 11.3).

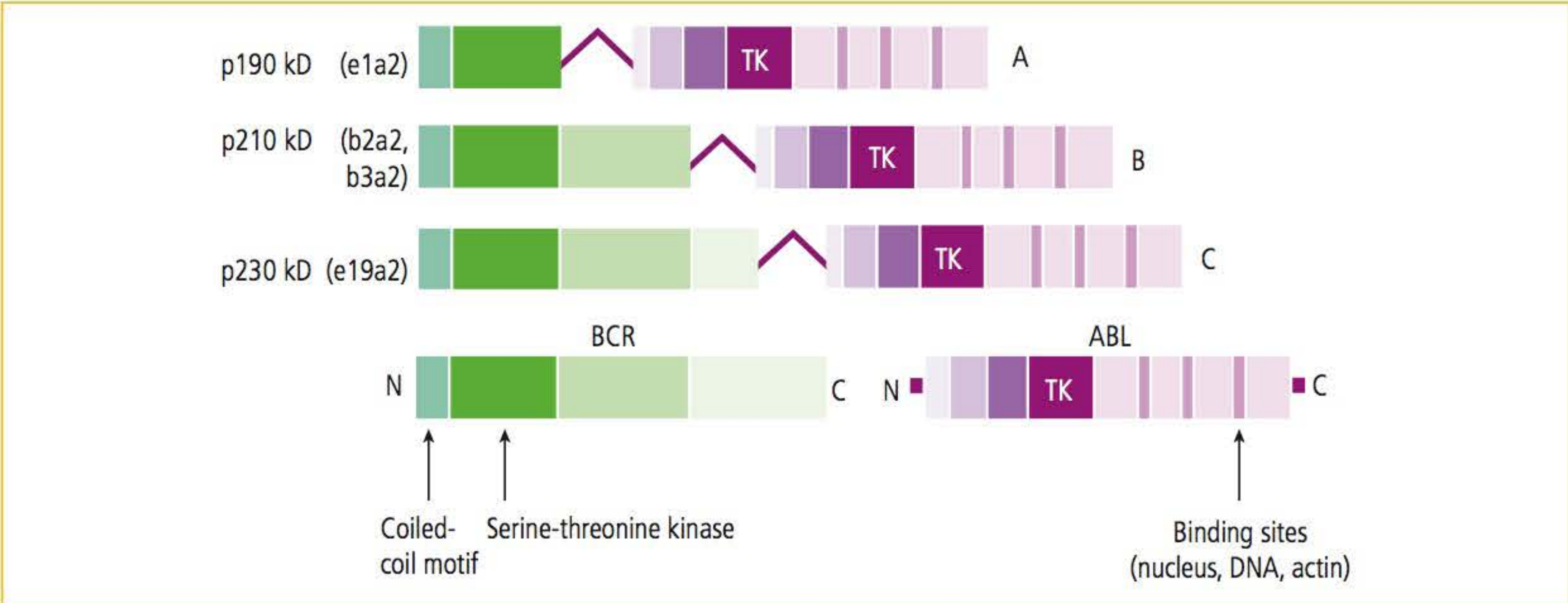
QUADRO 11.3 Classificação das neoplasias mieloproliferativas	
BCR-ABL POSITIVO (Ph1)	
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Leucemia mieloide crônica típica (LMC)</li><li>▪ Leucemia neutrofílica crônica (LNC)</li></ul>	
BCR-ABL NEGATIVO (Ph1-)	
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Policitemia vera (PV)</li><li>▪ Trombocitemia essencial (TE)</li><li>▪ Mielofibrose primária (MFI)</li><li>▪ Leucemia eosinofílica crônica (LEC)/Síndromes eosinofílicas (SE)</li><li>▪ Neoplasias mieloproliferativas não classificadas (NMPnc)</li><li>▪ Mastocitose (MT)</li></ul>	

Fonte: Mufti e colaboradores.<sup>28</sup>

Muitos estudos têm revelado que principalmente dois eventos genéticos estão associados às NMPs: a mutação *BCR-ABL*, na LMC (Figuras 11.13 e 11.14), e a mutação *JAK2* (*Janus-Kinase*), nos portadores de PV, TE e MFI (Figuras 11.15 e 11.16). Essas mutações possuem em comum o envolvimento de genes/proteínas associados à atividade tirosinoquinase. A mutação *JAK2* é uma mutação de ponto, somática, adquirida, detectada em células eritroides e mieloides e que ocorre no éxon 14 do gene *JAK2*, onde há uma troca de uma guanina (G) por uma timina (T) com consequente substituição de uma valina (V) por uma fenilalanina (F) na posição 617 da proteína codificada (*JAK2 V617F*). A mutação *JAK2 V617F* não foi encontrada em linfócitos T.

Campbell e Green, em 2005, demonstraram a presença da mutação *JAK2V617F* em 95% dos pacientes com PV e em 50 a 60% dos pacientes com TE ou MFI. Em estudo similar, Costa e Monte-Mór,<sup>31</sup> mostraram positividade para *JAK2V617F* de 96% para portadores de PV, 28% para TE e 56% para MFI.<sup>31,32</sup>

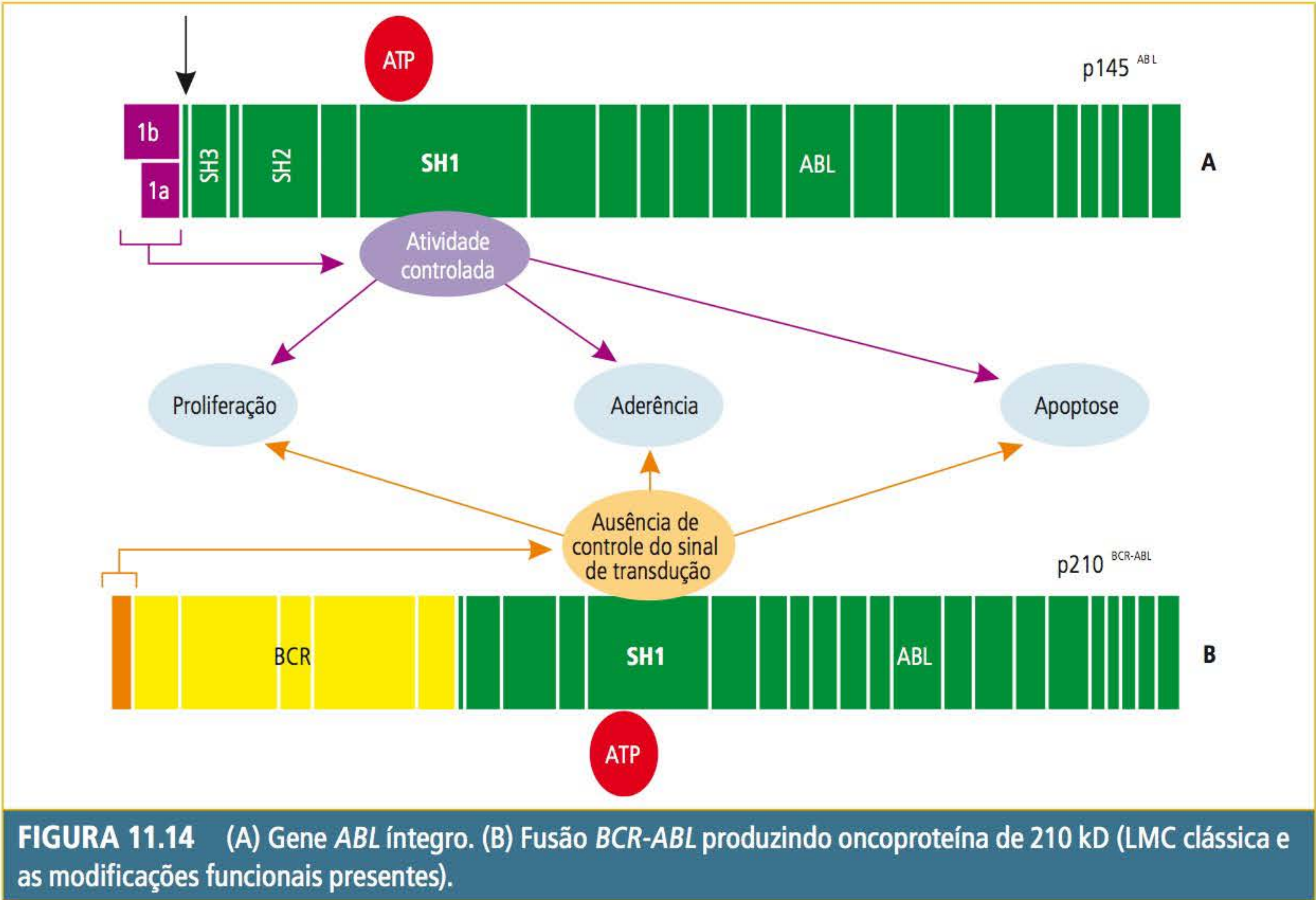
A presença dessas mutações leva a um estado de hipersensibilidade de células progenitoras hematopoiéticas (precursores mieloides) a diversas citocinas e fatores de crescimento, incluindo eritropoietina (EPO), interleucina-3 (IL-3), *stem cell factor* (SCF), *insulin like growth factor* (IGF-1), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) e trombopoietina (TPO) ou a um estado de independência desses fatores.<sup>31,32</sup> A partir



**FIGURA 11.13** Tipos com maior possibilidade de inserção na fusão *BCR-ABL*. Tamanhos de oncoproteínas produzidas associadas ao tipo de neoplasia hematológica: (A) proteína de 190 kD – leucemia linfoblástica aguda (LLA); (B) proteína de 210 kD – leucemia mieloide crônica clássica (LMC); (C) proteína de 230 kD – leucemia neutrofílica crônica (LNC).

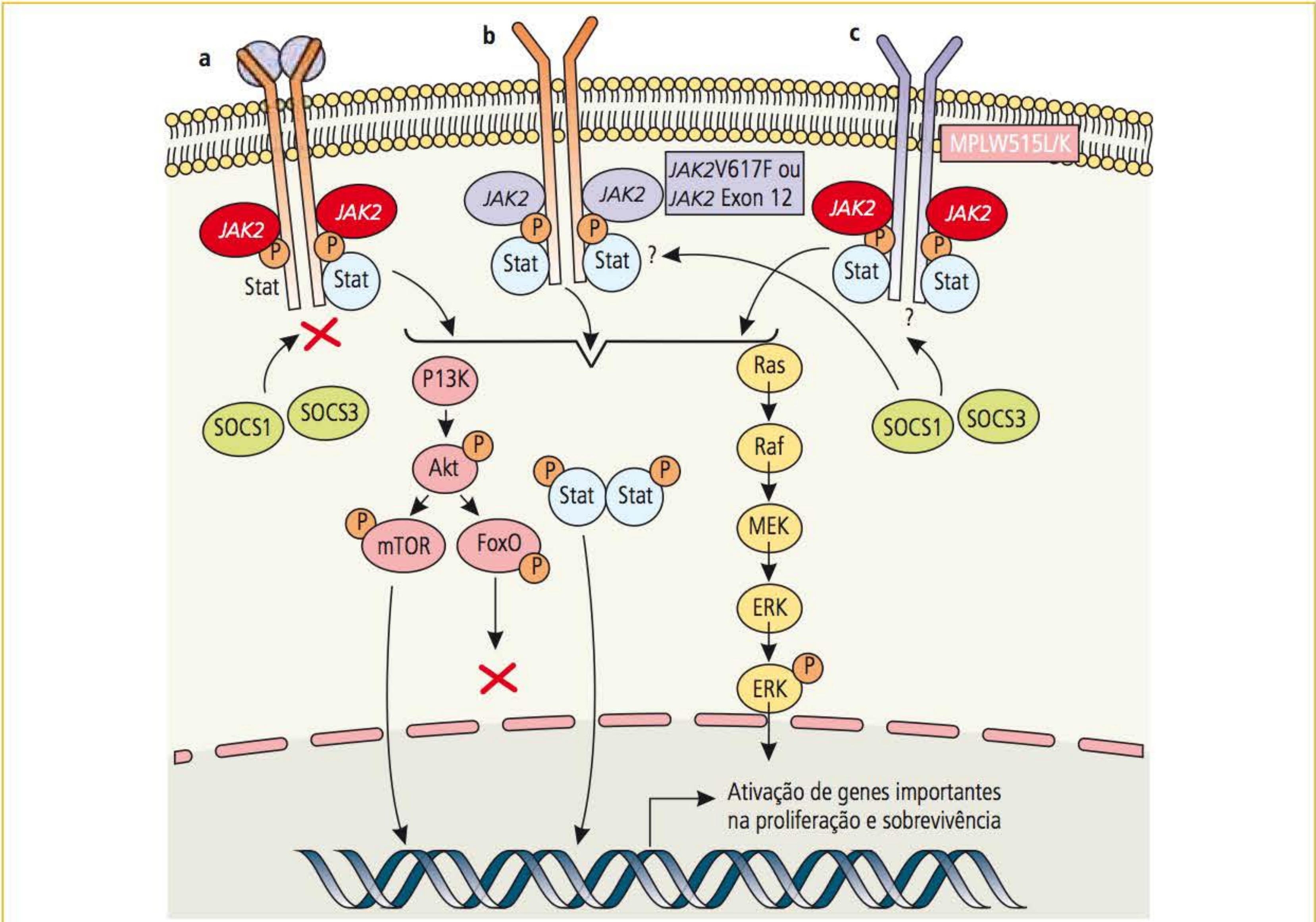
Fonte: Adaptada de Goldman e Melo<sup>29</sup> e Hehlmann e colaboradores.<sup>30</sup>





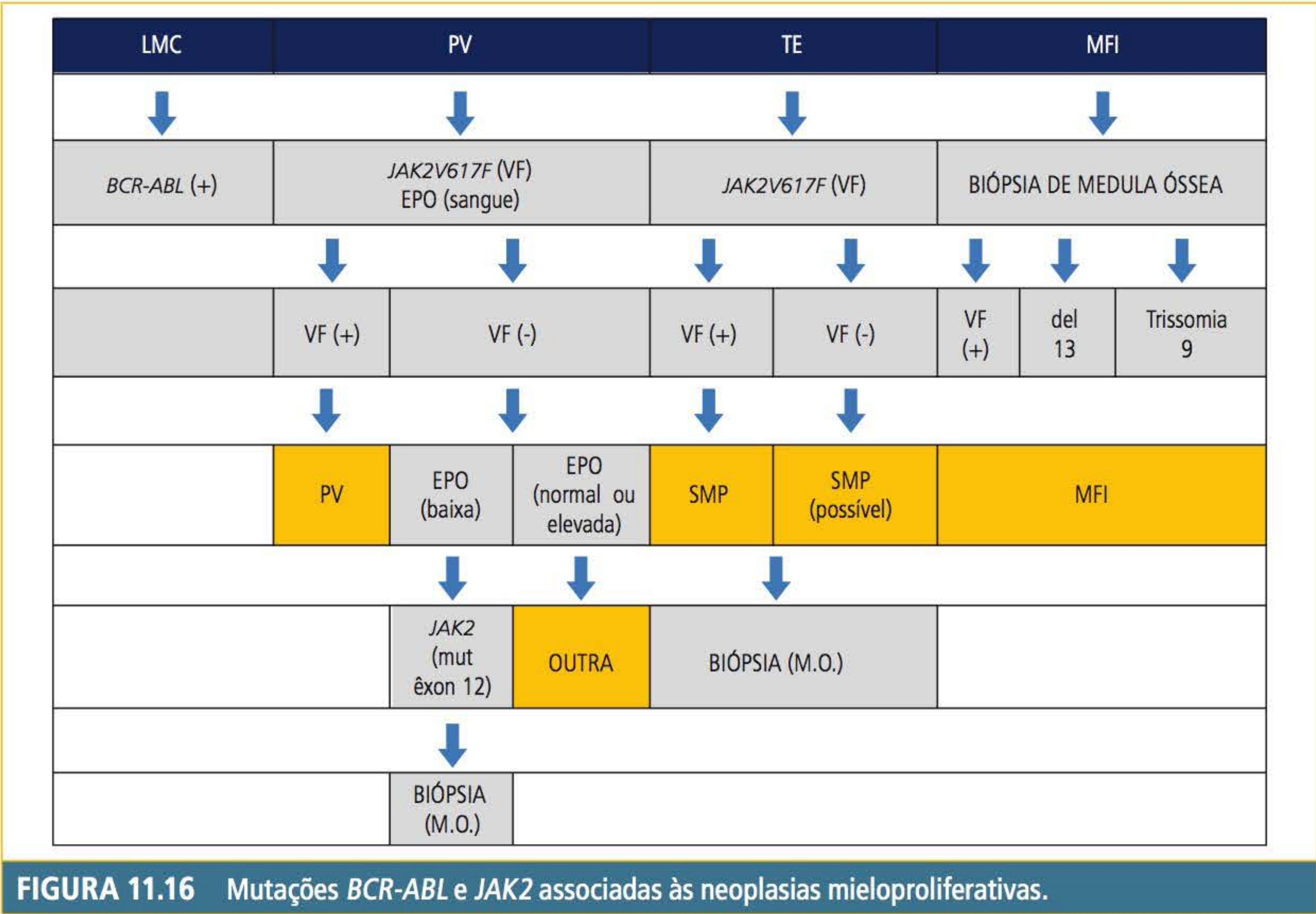
**FIGURA 11.14** (A) Gene *ABL* íntegro. (B) Fusão *BCR-ABL* produzindo oncoproteína de 210 kD (LMC clássica e as modificações funcionais presentes).

Fonte: Goldman e Melo.<sup>29</sup>



**FIGURA 11.15** JAK2-normal/mutaçãoV617F/éxon 12/MPLW515L/K.



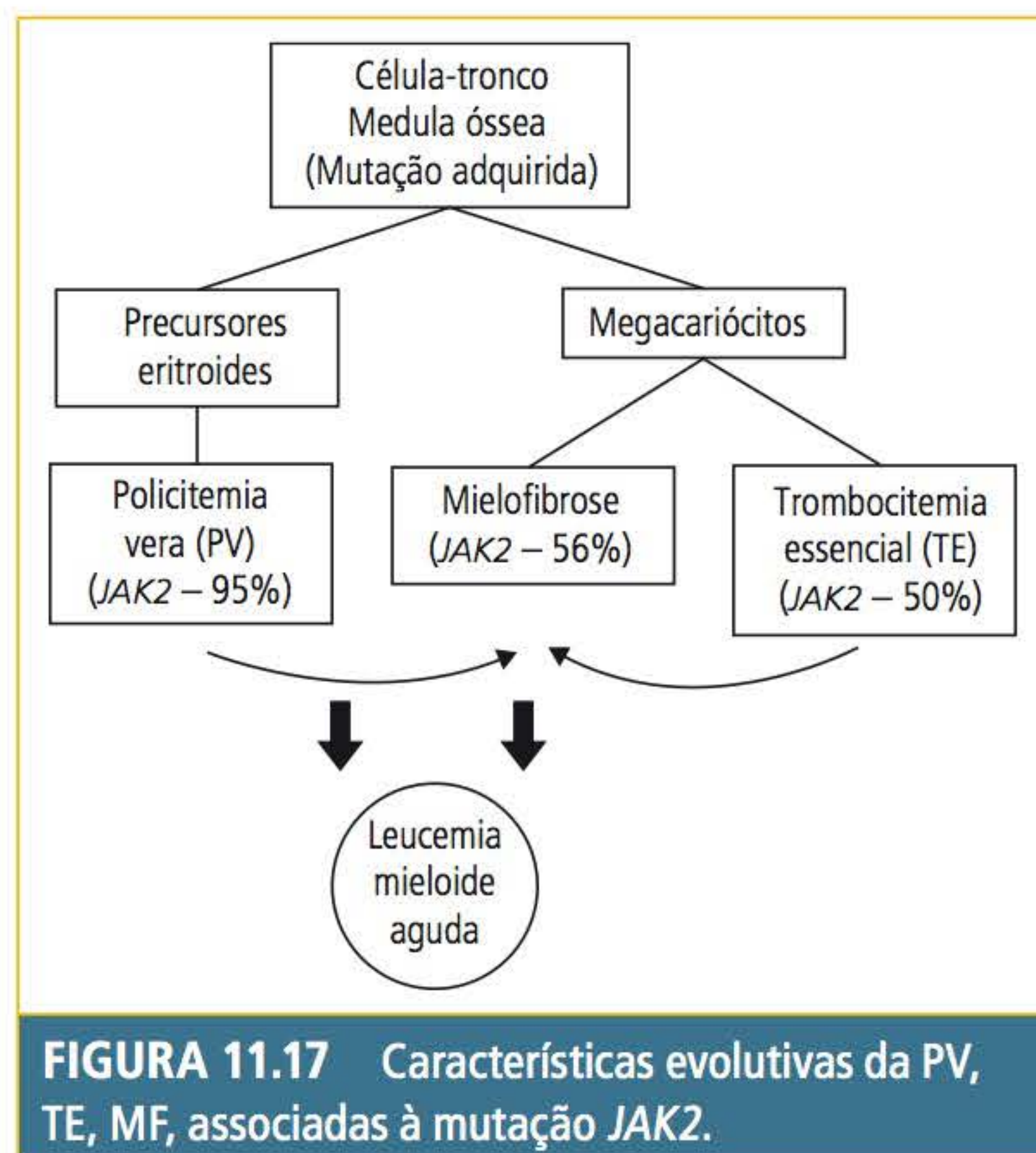


desses conhecimentos, surge uma dúvida: como três doenças distintas, PV, TE e MFI, do ponto de vista de apresentação morfológica e clínica, podem ser causadas por uma mesma mutação? Várias hipóteses foram levantadas, sendo que algumas encontram ressonância para o entendimento desse fato. A primeira delas e mais simplista se debruça sobre a natureza da célula progenitora afetada e a variabilidade do envolvimento de cada linhagem (eritroide, granulocítica ou megacariocítica), determinando, dessa forma, o aumento proeminente da massa eritroide na PV, o aumento de plaquetas na TE e o aumento de granulócitos e plaquetas na MFI, sendo ainda que esse último estimularia na medula óssea uma elevação do número de fibroblastos residentes, acarretando uma grande deposição de colágeno, a qual é a responsável pela fibrose. A segunda hipótese, com maior evidência de aceitação, está associada ao nível de atividade *JAK2V617F*, sugerindo que baixos níveis favorecem a atividade megacariocítica e, portanto, TE, ao passo que altos níveis produzem efeito eritroide, ou seja, PV. Ainda nessa hipótese, a atividade sustentada e dependente do tempo de exposição provoca o estado de fibrose, ou seja, MFI. Estudos têm demonstrado que o estado de zigose

também parece ter papel relevante nesse processo de menor ou maior atividade *JAK2V617F*, pois a homozigose provoca uma elevação da atividade quinásica mutada, não só decorrente do aumento da produção, mas também da falta de competição ocasionada pela proteína no estado selvagem (*JAK2WT*). Em pacientes com PV e, portanto, com maior atividade *JAK2V617F*, observou-se transição de uma população mista heterozigótica/homozigótica para uma população predominantemente homozigota. Por outro lado, de 93 a 100% dos portadores de TE são heterozigotos, enquanto aproximadamente 14% de pacientes com MFI são homozigotos. O entendimento do comportamento clínico, da gravidade e da prevalência em pacientes portadores de NMP sob esse prisma ou motivado por essas observações é fortemente sustentado. Pacientes com TE e *JAK2V617F* positivos podem ser considerados como portadores de PV com manifestação mínima ou apresentação incompleta; portadores de PV com homozigose apresentam concentrações de hemoglobina e índice de fibrose maiores que aqueles com heterozigose. Dessa forma, não seria equivocado interpretar que PV, TE e MFI podem ser etapas diferentes de uma mesma doença, cujo processo se inicia com



mutação em heterozigose, portanto TE, podendo progredir para PV e MFI como decorrência do aumento da atividade quinásica e do tempo de exposição, isso tudo provocado por eventos gênicos que determinam essa evolução (**Figura 11.17**).<sup>32-39</sup>



Têm sido demonstrados casos de eosinofilia persistente, incluindo as leucemias eosinofílicas crônicas (LEC) e outras síndromes eosinofílicas, como associação de causa, principalmente com mutações em genes que codificam receptores  $\alpha$  (alfa) ou  $\beta$  (beta) de fatores de crescimento derivados de plaquetas (*PDGF- $\alpha$ /PDGF- $\beta$* ) e receptores para fator de crescimento de fibroblastos-1 (*FGFR1*) (8p11.2). Esse último, no entanto, pode apresentar-se, inicialmente, como uma leucemia linfoblástica/linfoma de células T ou B com acentuada eosinofilia e, posteriormente, evoluir para uma NMP.<sup>8</sup> Eosinofilia persistente em que não sejam encontradas alterações cromossômicas/gênicas, após exaustivas investigações e possíveis causas de eosinofilia reativa, deve ser classificada como síndrome eosinofílica idiopática (SEI).<sup>8</sup>

Vários critérios foram construídos, não só para classificar os subtipos de doenças existentes, mas também para diferenciá-las de situações em que ocorram hiperplasia mieloide, eritroide e plaquetária cuja origem seja reativa e não neoplásica. É importante compreender também que os vários critérios morfológicos estabelecidos pela OMS na revisão de 2008,<sup>8</sup> tanto do sangue periférico quanto da medula óssea, foram baseados em inúmeros estudos de casos e, portanto, devem ser analisados

e interpretados de forma conjunta com os aspectos clínicos. A interpretação isolada de achados laboratoriais únicos pode não ser elucidativa na identificação do subtipo específico.

### Policitemia vera (PV)

É uma doença clonal, adquirida, de célula-tronco da medula óssea, com prevalência em idades mais avançadas (idosos) e distribuição igual em ambos os sexos. Os sinais e sintomas clínicos podem ser dispneia, cefaleia, sudorese noturna, prurido principalmente após o banho quente, cianose, esplenomegalia e hemorragia, entre outros. Laboratorialmente, apresenta uma elevação dos valores do eritrograma (hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos), podendo ou não estar acompanhada de granulocitose (principalmente neutrofilia sem desvio nuclear à esquerda, podendo haver basofilia) e trombocitose não progressiva no sangue periférico. A medula óssea é hipercelular nas três linhagens (panmielose). A maioria dos sintomas é oriunda da hiperviscosidade, da hipervolemia e do hipermetabolismo. A concentração plasmática de eritropoietina é diminuída ou normal, caracterizando uma poliglobulia não reativa. De acordo com a última revisão e classificação da OMS,<sup>8</sup> podem ser usados critérios maiores e menores para o diagnóstico (**Quadro 11.4**).

#### QUADRO 11.4 Critérios maiores e menores para diagnóstico de policitemia vera

##### Critérios maiores

1. Hemoglobina > 18,5 g/dL (homens) – 16,5 g/dL (mulheres) ou outra evidência qualquer de aumento da série vermelha\*
2. Presença de JAK2 V617F ou outra mutação associada (mutação éxon 12 JAK2)

##### Critérios menores

1. Biópsia de medula óssea mostrando hipercelularidade proliferativa de todas as linhagens (panmielose)
2. Eritropoietina plasmática inferior ao valor mínimo de referência
3. Formação de colônia eritroide endogênica *in vitro*

\* Aumento da hemoglobina ou hematócrito superior ao percentil 99 para o sexo, a idade ou a altitude local de residência; elevação da hemoglobina igual ou maior que 17 g/dL (homens) e 15 g/dL (mulheres) associada ao aumento sustentado de pelo menos 2 g/dL, sem evidências de deficiência de ferro ou elevada massa eritroide.

**Fonte:** Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

A evolução e o prognóstico, em geral, são bons e com sobrevida mediana entre 10 e 15 anos. As maiores causas de complicação e morte são trombose e hemorragia, principalmente pela elevada viscosidade sanguínea e função plaquetária defeituosa, respectivamente. A migração para mielofibrose acontece em 30% dos casos e para leucemias agudas em 5%.<sup>40</sup>



Algumas situações específicas podem levar a uma diminuição do volume plasmático e produzir uma poliglobulia relativa, sendo mais frequentes os problemas cardiovasculares, tratamento com diuréticos, tabagismo e consumo exagerado de álcool, entre outros. Incide mais comumente em pessoas jovens, de meia-idade e do sexo masculino.<sup>40</sup>

Trombocitemia essencial (TE)

A TE é uma doença, na maioria dos casos, assintomática, cujo diagnóstico é realizado ao acaso, em hemograma de rotina. No entanto, podem ocorrer trombose e hemorragia. A esplenomegalia e a atrofia do baço também podem estar presentes.

Caracteristicamente, a TE apresenta trombocitose evidente, resultante de uma excessiva proliferação megacariocítica na medula óssea, ocasionada, em 50% dos casos, pela mutação *JAK2 V617F* e em 4% dos casos, pela mutação no gene produtor do receptor para trombopoietina na plaqueta, denominado *MPL*. Laboratorialmente, o achado determinante é a persistência da contagem de plaquetas superior a 450.000/ $\mu$ L. As linhagens eritroides e granulocíticas apresentam-se normais, sem evidências de hiperproliferação. Devem ser descartadas as trombocitoses que ocorrem na carência de ferro, doenças inflamatórias ou neoplásicas e na mielodisplasia com trombocitose (anemia refratária com sideroblastos em anel associada à intensa trombocitose [ARSA-IT]). O exame da medula óssea mostra uma hipercelularidade como na PV, porém com excesso de megacariócitos, os quais são funcionalmente anormais (Quadro 11.5). As provas de função plaquetária, em geral, estão alteradas, principalmente o teste de agregação plaquetária induzida por adrenalina.<sup>40</sup>

As complicações estão habitualmente associadas ao risco de trombose e hemorragias. Nos casos específicos de trombose, possui maior risco os portadores com mais de 60 anos de idade, trombose prévia e contagem de plaquetas superior a 1.500.000/ $\mu$ L.

Mielofibrose idiopática ou primária (MFI)

Também conhecida como mioesclerose, possui como características principais uma fibrose generalizada e progressiva da medula óssea, já no início da doença, e hematopoiese esplênica (metaplasia mieloide), responsáveis pela anemia e esplenomegalia presentes na maioria dos portadores. É bastante comum em pessoas idosas, podendo se instalar de maneira insidiosa e progressiva; os sintomas de anemia, desconforto e dor abdominal são os achados clínicos mais comuns. Podem estar

QUADRO 11.5 Critérios diagnósticos para trombocitemia essencial (TE)

- 1. Contagem de plaquetas persistentemente superior a 450.000/ $\mu$ L
- 2. Biópsia de medula óssea com proliferação megacariocítica e expressivo número de megacariócitos anormais (grandes e imaturos)
- 3. Ausência de critérios para PV (OMS)\*, para MFI#, LMC (Ph1+)\$, SMD&, outra neoplasia mieloide
- 4. Mutação *JAK2V617F*, mutação *MPL* (*MPL W515K* ou *MPL W515L*), outra mutação clonal Ausência de evidências de trombocitose reativa¥

O diagnóstico de TE requer a presença dos quatro critérios listados.  
\* Exclusão baseada nos níveis de hemoglobina e hematócrito.  
# Ausência de fibrose reticulínica, de reação leucoeritoblástica e de marcada hipercelularidade da medula óssea acompanhada de morfologia megacariocítica típica de MFI (pequenos e grandes megacariócitos, elevada relação N/C, cromatina densa e hipercromasia lobular).  
\$ Ausência de *BCR-ABL*.  
& Ausência de diseritropioese e disgranulopoiese.  
¥ Ausência de trombocitose reativa: deficiência de ferro, esplenectomia, cirurgias, inflamação, doenças do tecido conectivo, metástases e doenças linfoproliferativas (a presença de condição associada à trombocitose reativa não exclui a possibilidade de TE caso esteja presente algum dos critérios acima).

Fonte: Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

presentes ainda sintomas como perda de peso, anorexia, febre e sudorese noturna e dor óssea, sendo essa última menos comum. Além da mutação *JAK2* presente em 50% dos casos, as mutações *TET-2* e *MPL* podem ser encontradas em aproximadamente 15% dos pacientes, além de outras anormalidades citogenéticas não específicas.<sup>8,40</sup>

Os achados laboratoriais mais importantes estão presentes no exame do sangue periférico e da medula óssea (Quadro 11.6).

QUADRO 11.6 Achados laboratoriais no sangue periférico e na medula óssea na mielofibrose idiopática

- Sangue periférico (SP)**
- 1. Leucocitose e trombocitose inicial (ao diagnóstico), podendo evoluir para leucopenia e trombocitopenia (fase avançada da doença)
  - 2. Anemia é mais comum. Excepcionalmente, valores elevados de hemoglobina podem ser encontrados. Presença de células em "gota" ou "lágrima" (dacriócitos)
  - 3. Presença de precursores eritroides (eritroblastos) e mieloides (neutrófilos) no SP (reação leucoeritoblástica)
- Medula óssea**
- 1. Medula óssea hipercelular com fibrose
  - 2. Aumento no número de megacariócitos pode estar presente com frequência
  - 3. A punção pode ser "seca" em virtude da fibrose; necessidade de biópsia



Os critérios diagnósticos, segundo a OMS na revisão de 2008,<sup>8</sup> também são importantes, uma vez que determinam uniformidade ou padronização, minimizando variabilidade diagnóstica (**Quadro 11.7**).

**QUADRO 11.7** Critérios da OMS para diagnóstico de mielofibrose idiopática

**Critérios maiores**

1. Proliferação megacariocítica com atipia\* associada à fibrose colagenosa ou reticulínica ou hiperplasia granulocítica de medula óssea com visível diminuição da eritropoiese (fase pré-fibrótica)
2. Ausência dos critérios (OMS) para PV\*, SMD e outras neoplasias mieloides; *BCR-ABL* negativo
3. Presença da mutação *JAK2V617F* ou outro marcador clonal como *MPLW515K/L*#

**Critérios menores**

1. Reação leucoeritroblástica
2. Níveis plasmáticos elevados de desidrogenase láctica (LDH)
3. Anemia
4. Esplenomegalia palpável

O diagnóstico de MFI requer a presença de pelo menos três critérios maiores e dois menores.

\* Exclusão baseada nos níveis de hemoglobina e hematócrito.

& Ausência de diseritropoiese e disgranulopoiese.

# Na ausência desses marcadores, porém sem evidências de fibrose da medula óssea secundária a infecções, doenças autoimunes, doença inflamatória crônica, leucemia de células pilosas ou outras neoplasias linfoides, metástases e mielopatias tóxicas.

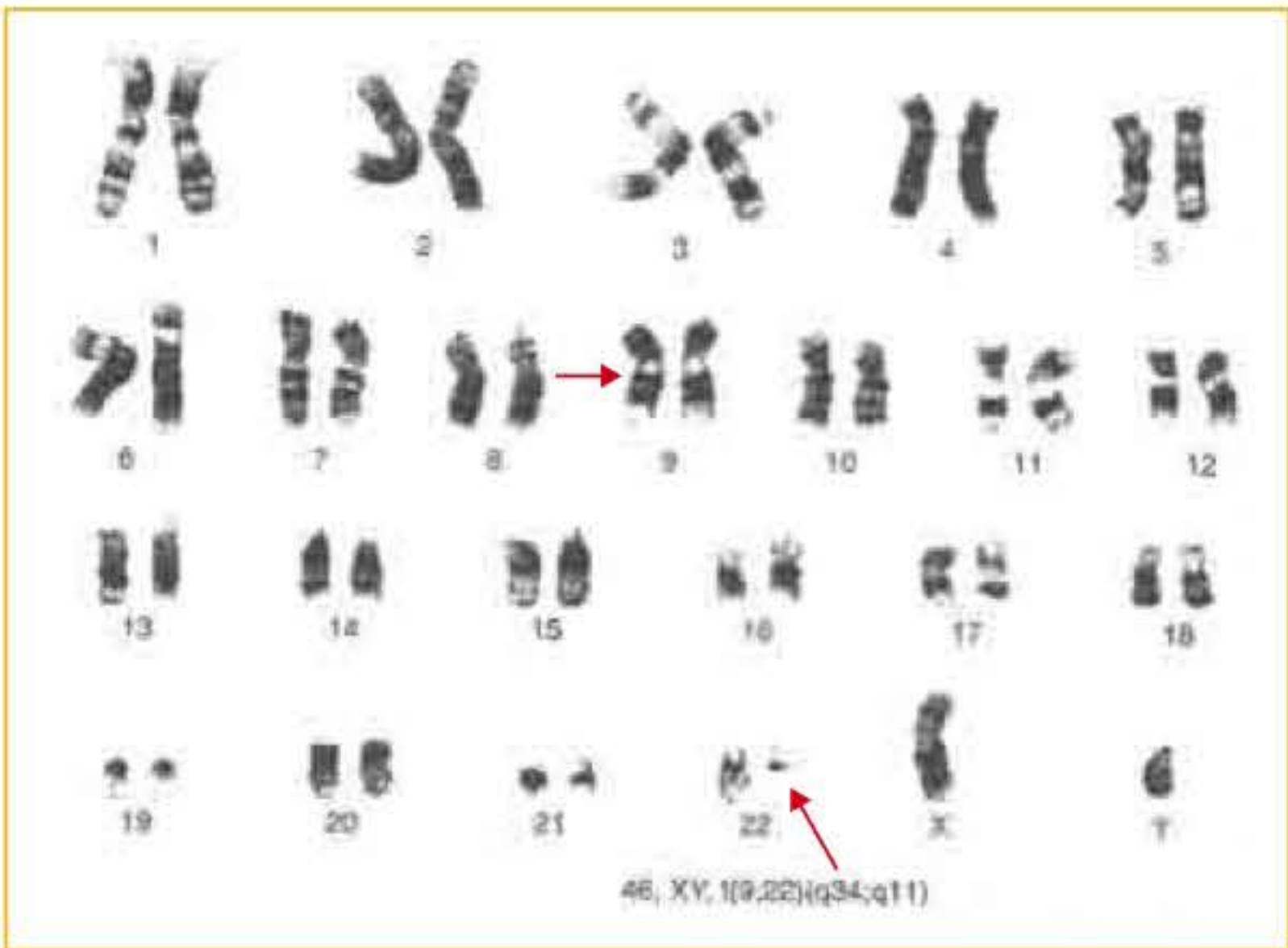
¥ Megacariócitos pequenos ou grandes com elevada relação N/C, hipercromasia nuclear, condensação cromatínica, núcleo dobrado e agrupado.

Fonte: Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

Leucemia mieloide crônica (LMC)

A LMC é uma doença mieloproliferativa clonal e de desenvolvimento inicial crônico.<sup>12</sup> Pode ocorrer em qualquer idade, tendo, no entanto, maior incidência em pessoas acima da quarta década de vida (idade média de 53 anos).<sup>12</sup> Já foi relatada em recém-nascidos e também em pessoas com idade superior a 93 anos. Não é uma doença comum da infância, com incidência abaixo de 5%, levando-se em consideração todas as leucemias.<sup>12</sup> Possui leve prevalência no sexo masculino, com uma relação aproximada de 3:2, e o único fator de risco conhecido é a radiação ionizante. Possui como causa citogenética a translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, determinando a formação de um gene híbrido *BCR-ABL* com atividade tirosinoquinase e denominado de cromossomo Philadelphia (Ph1), em homenagem à cidade onde essa alteração foi descrita pela primeira vez.<sup>41</sup> À época, as técnicas de bandeamento cromossômico ainda não eram realizadas, e o que se via no exame

de cariótipo era um cromossomo 22 muito pequeno.<sup>42</sup> A parte do braço longo do cromossomo 22 perdida para o cromossomo 9, é grande e a parte recebida do mesmo é pequena, fazendo com que o cromossomo 22 fique menor, caracterizando, desse modo, o cromossomo Philadelphia. Com o advento da coloração por bandeamento, na década de 1970,<sup>12</sup> foi possível identificar todos os cromossomos da constituição de uma célula. A coloração por bandeamento permitiu que se soubesse, com certeza, a composição do cromossomo Philadelphia (**Figura 11.18**).



**FIGURA 11.18** Cariótipo pela coloração de banda G, demonstrando t(9;22), caracterizado pelo encurtamento do braço longo do cromossomo 22 (setas).

Atualmente, por meio de métodos mais modernos e da biologia molecular, sabe-se que o ponto exato de quebra dos cromossomos 9 e 22 é na região 34 (9q34), no primeiro, e na região 11, no segundo (22q11). Os pontos de quebra na t(9;22) ocorrem sempre dentro dessas regiões gênicas, onde estão localizados os proto-oncogenes *ABL* (vírus da leucemia murina de Abelson) no cromossomo 9 e *BCR* (*breakpoint cluster region*) e *SIS* (vírus do sarcoma símio) no cromossomo 22. Porém, isso nem sempre ocorre no mesmo local dentro do gene, levando à formação de diferentes transcritos (RNAm), os quais podem codificar diferentes proteínas, 190 Kda (p190), 210 Kda (p210) e 230 Kda (p230); cada uma delas está associada com diferentes subtipos leucêmicos: a p190 está relacionada com a leucemia linfoblástica aguda (LLA), a p210, com a LMC, e a p230, com a leucemia neutrofílica crônica (LNC) (**Figuras 11.13 e 11.14**).

A história natural dessa doença apresenta três fases: fase inicial e mais prolongada, denominada



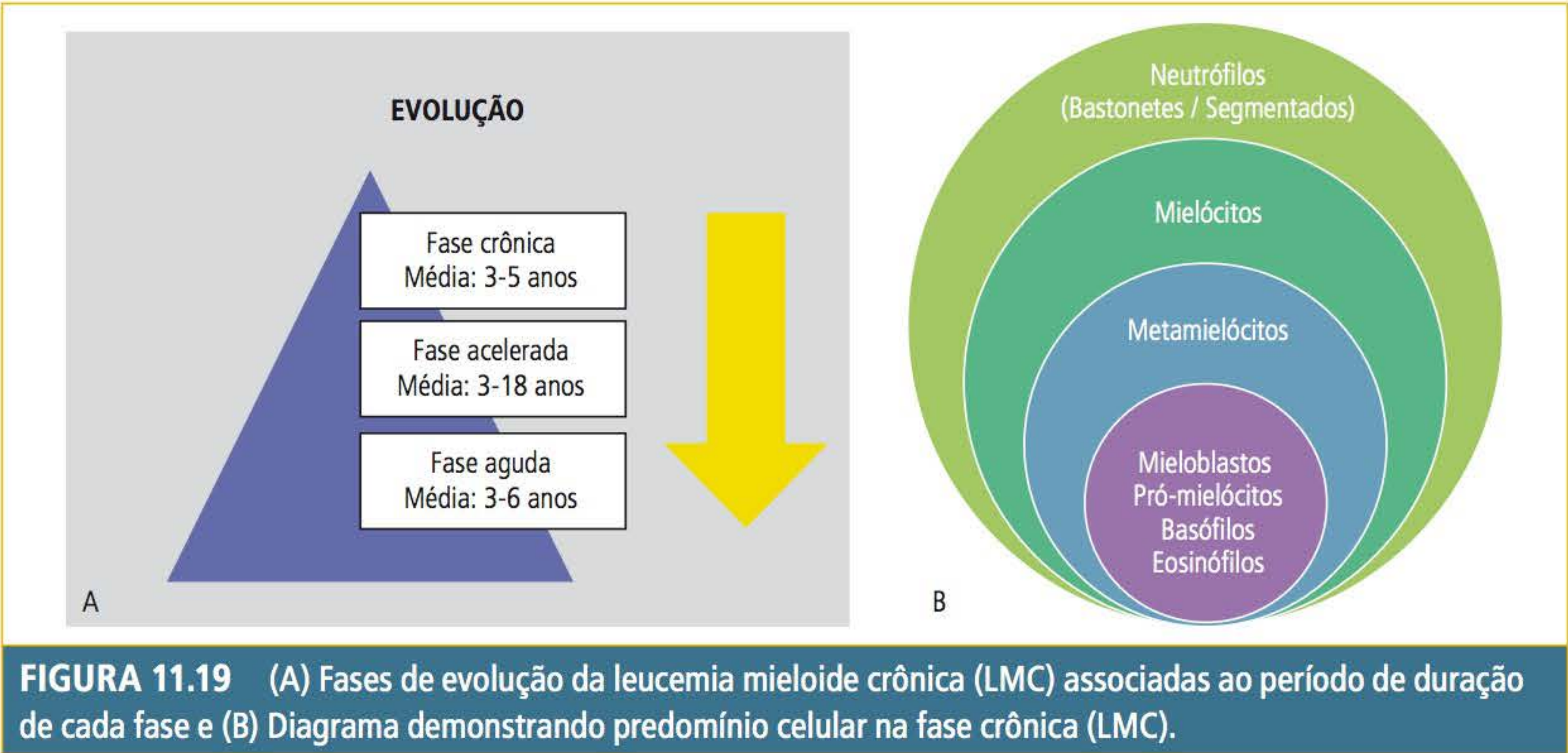
de **fase crônica**, **fase acelerada** (intermediária) e fase avançada, chamada de **crise blástica** (também denominada anteriormente de fase aguda). Essa última é a fase terminal da doença. Os motivos de diferenciação entre essas três fases são derivados dos tipos celulares encontrados tanto na medula óssea quanto no sangue periférico (**Figura 11.19**).

Os principais sinais e sintomas estão associados aos distúrbios provocados pela proliferação intensa e descontrolada de células na medula óssea e, consequente evasão dessas células para o sangue periférico. Os principais achados são esplenomegalia em um percentual bastante elevado de pacientes, provocando importante desconforto abdominal; anemia de intensidade variável, podendo ser progressiva; equimoses ou sangramentos (vaginal, epistaxe, entre outros) devidos geralmente à deficiência funcional plaquetária e raramente à trombocitopenia; hiperuricemia e gota causada pelo excessivo catabolismo de purinas; sintomas relacionados ao aumento da viscosidade e/ou estase sanguínea, tais como distúrbios visuais e da coagulação, além de priapismo.<sup>40,43</sup> Os achados laboratoriais do hemograma são habitualmente proeminentes, exuberantes e típicos, quando a doença já se encontra instalada, resultantes da hiperplasia mieloide da medula óssea e constituídos, no sangue periférico, principalmente por leucocitose (muitas vezes extrema), neutrofilia com desvio nuclear à esquerda não escalonado dos neutrófilos (presença maior de precursores mais jovens como mielócitos e metamielócitos do que bastonetes, não obedecendo à ordem normal

de liberação dessas células pela medula óssea), basofilia, trombocitose e anemia. Porém, é de suma importância salientar que, na fase muito inicial dessa doença, o diagnóstico pode ocorrer ao acaso, quando da realização de hemograma de rotina, pois os sinais e sintomas clínicos poderão estar ausentes, bem como os achados laboratoriais ainda serem mínimos, como uma discreta leucocitose com desvio nuclear à esquerda não escalonado, ausência de anemia e de trombocitose.<sup>43</sup>

Fase crônica

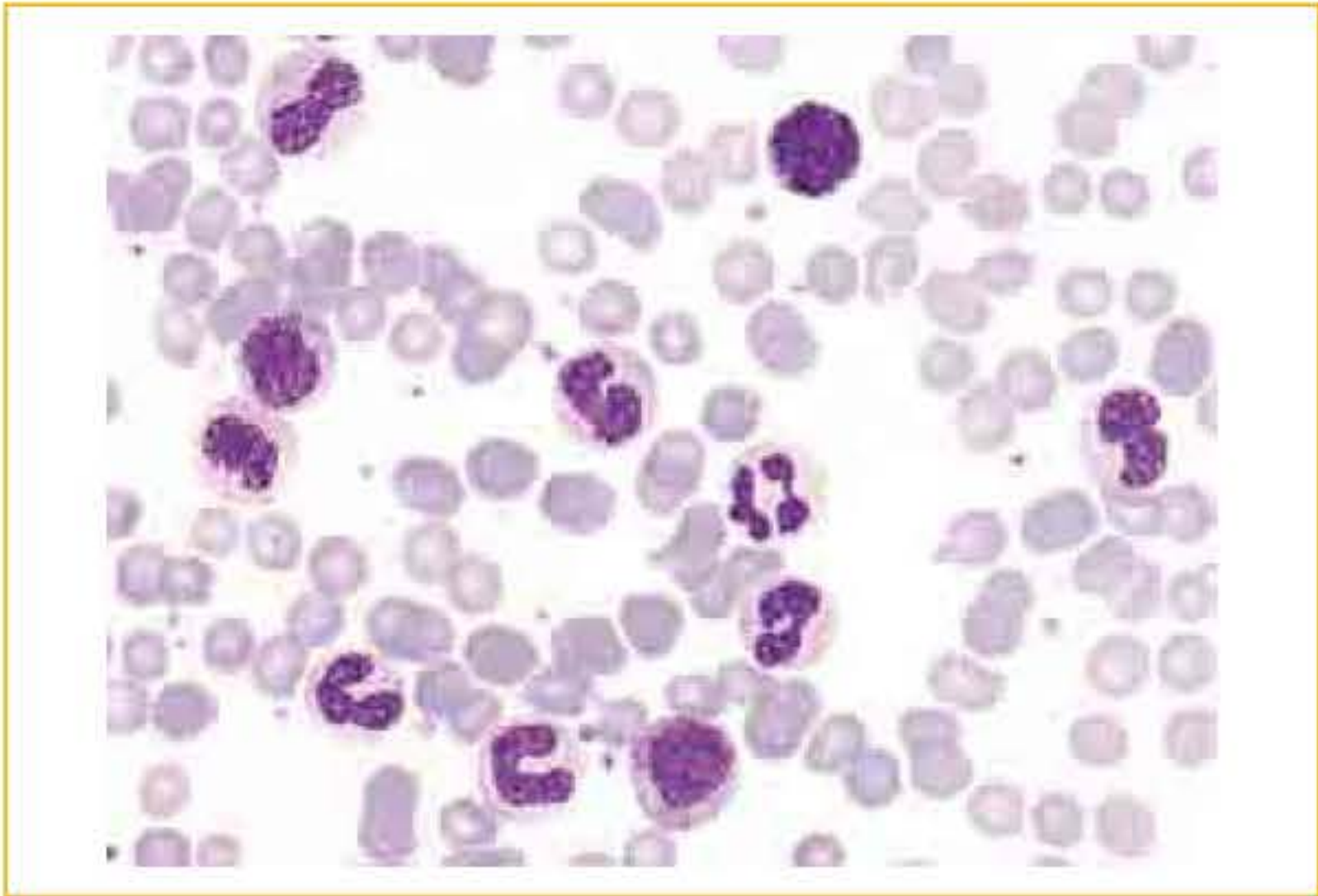
Nessa fase, a intensidade dos sintomas e dos achados laboratoriais é dependente do grau de comprometimento da medula óssea. Ainda assim, os achados no sangue periférico caracterizam-se por uma leucometria, geralmente acima de 25.000/ $\mu$ L, porém, progressiva, atingindo com facilidade valores entre 100.000 e 300.000 leucócitos/ $\mu$ L, podendo, mais raramente, ser superior a 400.000 leucócitos/ $\mu$ L. A contagem diferencial dos leucócitos demonstra hiperplasia da série mieloide, constituída principalmente por uma neutrofilia, com a presença de praticamente todas as fases de maturação (mieloblastos, pró-mielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e polimorfonucleares), predominando entre as células mais imaturas pró-mielócitos sobre os mieloblastos (geralmente, a quantidade de blastos e pró-mielócitos é inferior a 10%) e a de mielócitos sobre os dois (**Figura 11.19**). Os outros granulócitos, basófilos e eosinófilos também se encontram em geral aumentados, sendo a presença da basofilia (relativa e absoluta) uma característica muito particular na



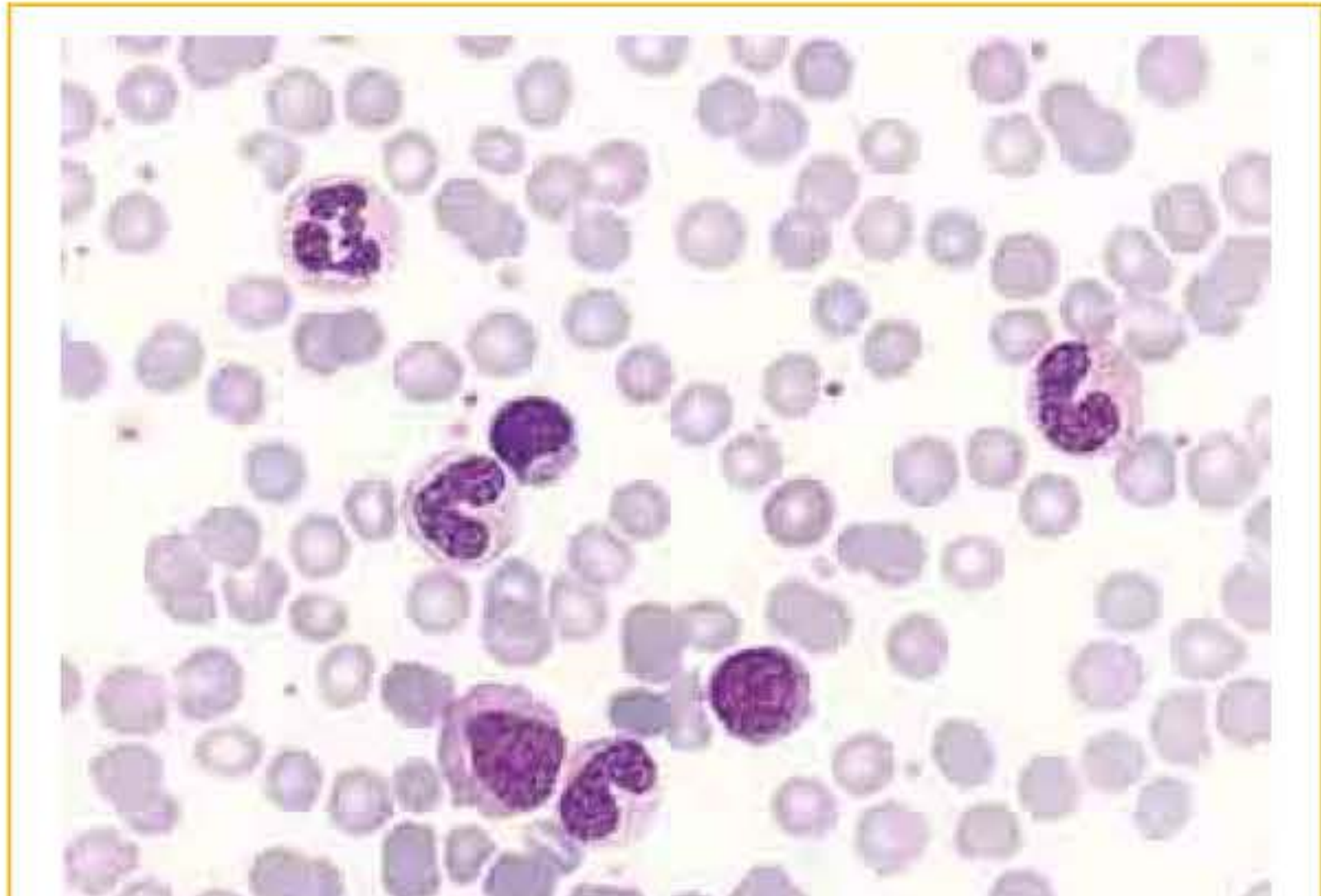


LMC (**Figuras 11.20 e 11.21**). Pode ocorrer anomalia de Pelger-Hüet adquirida.<sup>41</sup> A série vermelha mostra uma anemia normocítica e normocrômica, variando o seu grau proporcionalmente ao aumento do número de leucócitos. Em situações de extrema celularidade (leucocitose), pode haver um consumo excessivo de folato, derivando para uma anemia macrocítica do tipo megaloblástica. Outro achado não específico da LMC, mas muito comum, é a reação leucoeritroblástica (presença de eritroblastos juntamente com precursores mieloides no sangue periférico).<sup>5</sup> Trombocitose é o achado mais frequente, podendo, às vezes, a contagem ser superior a 1.000.000 de plaquetas/ $\mu$ L. No entanto, trombocitopenia pode acontecer em menos de 10% dos casos, bem como a contagem se encontrar dentro dos valores de referência.<sup>5,11</sup> A **Tabela 11.6** mostra os principais achados laboratoriais (principalmente no hemograma) na LMC.

O exame da medula óssea, de forma geral, não é mais informativo que o do sangue periférico, mas deve ser realizado para confirmação diagnóstica, para o exame citogenético e de biologia molecular (embora possa ser também utilizado o sangue periférico para esse fim) e para avaliação da presença e do grau de fibrose.<sup>43</sup> Demonstra também uma hipercelularidade com hiperplasia granulocítica, com a relação M:E variando entre 10:1 a 30:1.<sup>5</sup> Os megacariócitos se encontram normalmente aumentados em número, porém diminuídos em tamanho e com menor número de núcleos. O número de blastos não ultrapassa 5% das células nucleadas.<sup>11</sup> A prova da fosfatase alcalina leucocitária (FAL) é um instrumento que pode auxiliar muito no diagnóstico da LMC, pois se encontra diminuída ou ausente (*score* baixo ou igual zero) devido a uma proliferação descontrolada e neoplásica e não em resposta a um estímulo



**FIGURA 11.20** Esfregaço de sangue periférico mostrando vários graus de maturação de células mieloides (mielócitos, metamielócitos, bastonetes, segmentados, basófilo) (Coloração May-Grunwald-Giemsa [MGG] 400x).



**FIGURA 11.21** Esfregaço de sangue periférico mostrando vários graus de maturação de células mieloides (mielócitos, metamielócitos, bastonetes, segmentados, basófilo) (MGG 400x).

TABELA 11.6 Características do hemograma do sangue periférico na leucemia mieloide crônica – fase crônica		
ERITRÓCITOS	LEUCÓCITOS	PLAQUETAS
Anemia normocítica ou normocrômica discreta (eventualmente podendo ser macrocítica)	Geralmente > 25.000/ $\mu$ L Com frequência > 100.000/ $\mu$ L Raramente > 400.000/ $\mu$ L	Trombocitose (mais frequente)
Anisocitose discreta	Granulócitos em todos os graus de maturação {(MB,PM -10%),(MI, MT, BT, PMN)} DNNE não escalonado	Eleva-se na fase crônica > 500.000/ $\mu$ L (podendo ser > 1.000.000/ $\mu$ L)
Reação leucoeritroblástica	Basofilia/eosinofilia	Normal
Contagem de reticulócitos N/E	FAL diminuída ou ausente	Trombocitopenia (rara, < 10% dos casos)

MB, mieloblastos; PM, pró-mielócitos; MI, mielócitos; MT, metamielócitos; BT, bastonetes; PMN, polimorfonucleares; DNNE, desvio nuclear dos neutrófilos à esquerda; FAL, fosfatase alcalina leucocitária; N, normal; E, elevado.



infeccioso. A prova de fosfatase alcalina, junto com todos os outros achados laboratoriais, pode ser necessária para o diagnóstico diferencial entre LMC e reação leucemoide (RL). A RL se caracteriza por resposta hematológica exacerbada, percebida por intensa leucocitose e acompanhada de neutrofilia ou linfocitose extrema frente a processos infecciosos bacterianos ou virais. Ocorre com mais frequência em crianças, e o diagnóstico diferencial de LMC pode ser feito com achados no hemograma que indicam uma resposta inflamatória (processo benigno) e não uma neoplasia, como granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacuolizações citoplasmáticas nos neutrófilos (**Figura 11.22**).

Fase acelerada

Embora, após a fase crônica, a transformação blástica possa ocorrer de forma súbita e imediata, na maioria das vezes, ocorrerá uma intensificação da doença, denominada de fase intermediária ou acelerada (FA), caracterizada por alterações hematológicas, geralmente perceptíveis nos achados laboratoriais. Segundo os critérios propostos pelo International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR), o sangue periférico pode demonstrar, entre os diversos achados, leucocitose refratária ao tratamento, aumento da basofilia e da presença de células blásticas e/ou pró-mielócitos, anemia progressiva associada à trombocitopenia ou trombocitose proeminente e anomalia de Pelger-Hüet adquirida. O exame da medula óssea pode apresentar displasia, fibrose e anormalidades citogenéticas adicionais, além do cromossomo Philadelphia (**Quadro 11.8**).<sup>5,43,44</sup>

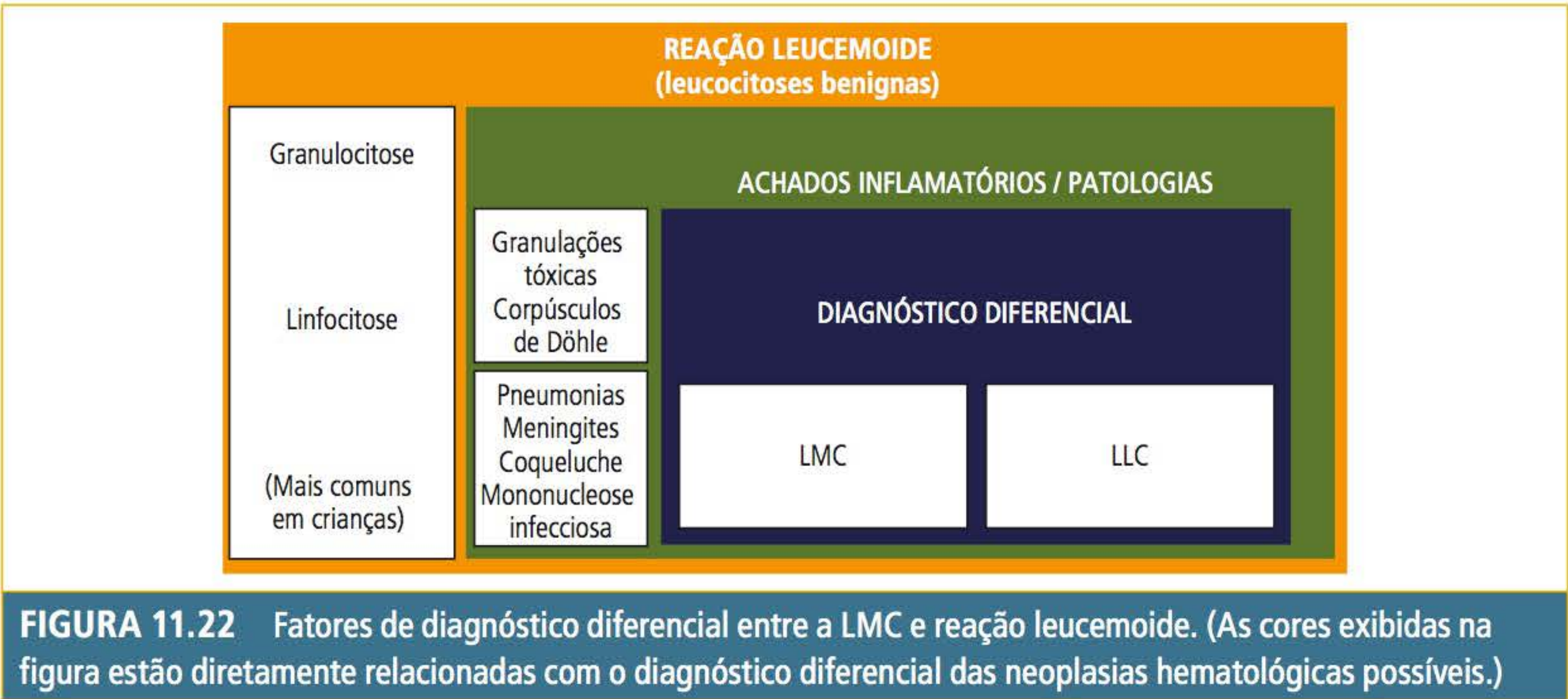
QUADRO 11.8 Critérios para determinação da fase acelerada

- Leucocitose intensa (superior a 100.000 leucócitos/ $\mu$ L) e refratária ao tratamento
- Anemia progressiva
- Trombocitopenia (não associada à quimioterapia) ou Trombocitose acentuada
- 10% < Blastos e pró-mielócitos < 20% (SP e/ou MO)
- Basofilia acentuada (superior a 20% – SP)
- Anormalidades citogenéticas adicionais (além do Ph1)

SP, sangue periférico; MO, medula óssea.  
**Fonte:** Adaptado de Giralt e colaboradores.<sup>45</sup>

Fase avançada – Crise blástica (CB)

Essa fase se caracteriza pela perda da maturação e diferenciação granulocítica e substituição dessas células por células sem maturação (blastos) na medula óssea e no sangue periférico, com o número de células blásticas superior a 20%. A transformação blástica pode comprometer tanto a linhagem mieloide (65% dos casos) quanto a linfoide (35% dos casos) ou mesmo ocorrer em ambas (bifenotípica), porém essa última em menos de 5% dos casos.<sup>5,11</sup> Na crise blástica, os tipos de leucemias agudas instaladas, quando mieloides, podem ter características morfológicas desde M0 a M7, e quando linfoides, geralmente se assemelham aos subtipos L1 e L2, podendo, muito raramente, ser do subtipo L3. Quanto ao tipo de linfócito envolvido, podem acometer linfócitos B e T, sendo mais comum, no entanto, o primeiro. Dessa forma, fica clara a necessidade da realização da imunofenotipagem para caracterização da linhagem envolvida, tendo em vista a diferença de comportamento e resposta ao tratamento entre elas.<sup>43,44</sup>



**FIGURA 11.22** Fatores de diagnóstico diferencial entre a LMC e reação leucemoide. (As cores exibidas na figura estão diretamente relacionadas com o diagnóstico diferencial das neoplasias hematológicas possíveis.)



Leucemia Neutrofílica Crônica

É um tipo de neoplasia mieloproliferativa rara, cuja causa citogenética também é o cromossomo Philadelphia, porém com um ponto de quebra dentro do gene diferente da LMC e da LLA, gerando uma proteína híbrida de 230 kD (Figura 11.13). Os critérios diagnósticos laboratoriais (hemograma) mais comuns são leucocitose moderada com neutrofilia, porém sem desvio nuclear dos

neutrófilos à esquerda, predominando neutrófilos com boa maturação (neutrófilos segmentados). Geralmente, não se observam basofilia, eosinofilia e blastos no sangue periférico. A medula óssea apresenta quantidade menor de 5% de blastos entre as células nucleadas (Quadro 11.9).

A Quadro 11.10 mostra os critérios laboratoriais para diagnóstico diferencial entre os tipos de neoplasias mieloproliferativa e RL.

QUADRO 11.9 Critérios diagnósticos morfológicos na leucemia neutrofílica crônica segundo OMS-2008	
SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
<ul style="list-style-type: none"><li>Leucocitose ≥ 25.000 leucócitos/μL</li><li>Neutrófilos e segmentados &gt; 80%</li><li>Granulócitos imaturos (pró-mielócitos, mielócitos e metamielócitos) &lt; 10%</li><li>Ausência de basofilia e eosinofilia</li><li>Blastos &lt; 1%</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Hiperplasia de medula óssea</li><li>Aumento do número de granulócitos neutrófilos</li><li>Maturação neutrofílica normal</li><li>Blastos &lt; 5% das células nucleadas da MO</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Ausência de causas de neutrofilia fisiológica</li><li>Ausência de processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos</li><li>Sem evidências de PV, TE, MFI, SMD, SMD/NMP</li></ul>	

PV, policitemia vera; TE, trombocitemia essencial; MFI, mielofibrose; SMD, síndrome mielodisplásica; NMP, neoplasia mieloproliferativa.  
Fonte: Adaptado de Vardman e Hyjek.<sup>46</sup>

QUADRO 11.10 Quadro comparativo para o diagnóstico diferencial dos achados laboratoriais do sangue periférico (hemograma) nas neoplasias mieloproliferativas			
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS NMPS			
	Eritrócitos	Leucócitos	Plaquetas
HEMOGRAMA (SANGUE PERIFÉRICO)			
LMC clássica (Ph1+)	<ul style="list-style-type: none"><li>Anemia</li><li>Eritroblastos</li></ul>	Geralmente > 25.000/μL ou > 100.000/μL {PM, (MI, MT e BT – 40%)} Eosinofilia/basofilia FAL ↓	N/E > 600.000/μL 1.000.000/μL ou mais raramente trombocitopenia
PV	<ul style="list-style-type: none"><li>Hematócrito ↑</li><li>Hb &gt; 18,5 g/dL(homens) e 16,5 g/dL (mulheres)</li><li>Não reativa</li></ul>	12.000-30.000/μL (ausência de elevação progressiva)	> 400.000/μL
TE	Normal	Normal	> 600.000/μL (persistência > 2 meses)
MFI	<ul style="list-style-type: none"><li>Anemia</li><li>Reação leucoeritroblástica</li><li>Pecilocitose (dacriócitos)</li></ul>	12.000-30.000/μL (ausência de elevação progressiva)	Trombocitose discreta (> 450.000/μL)
Leucemia neutrofílica crônica	<ul style="list-style-type: none"><li>Anemia</li><li>Eritroblastos (raros)</li></ul>	25.000-50.000/μL (raro > 100.000/μL, MI, MT) (90-95% neutrófilos – PMN, BT) FAL N/E	Normal Trombocitopenia (100-149 mil/μL)
Reação leucemoide	Não relacionada	30.000-100.000/μL Neutrofilia (BT, PMN, GTN, Döhle, VCN, FAL elevada)	Normal Pode estar diminuída

BT, bastonetes; PMN, polimorfonucleares; MI, mielócitos; MT, metamielócitos; GTN, granulações tóxicas nos neutrófilos; VCN, vacuolizações citoplasmáticas nos neutrófilos; FAL, fosfatase alcalina leucocitária; N, normal; E, elevado.



Leucemia eosinofílica crônica/  
Síndromes eosinofílicas (LEC/SE)

A LEC/SE é uma doença mieloide clonal, cuja principal característica é a presença aumentada de eosinófilos tanto na medula óssea quanto no sangue periférico (> 1.500 eosinófilos/ $\mu$ L).<sup>5</sup> A contagem de blastos na medula óssea deve estar entre 5 e 20%, demonstrando a expansão clonal neoplásica. Entretanto, nos casos de contagem de blastos inferior a 5%, não se caracteriza a clonalidade, e deve ser considerada uma síndrome hipereosinofílica. A leucometria pode estar normal, discretamente aumentada ou ter um aumento intenso. A contagem de plaquetas, geralmente, é normal ou discretamente diminuída, e a anemia pode ou não estar presente no diagnóstico.<sup>5</sup> A pesquisa do cromossomo Philadelphia ou do gene quimérico *BCR-ABL* é negativa.<sup>5</sup> As translocações cromossômicas mais frequentemente relacionadas com a LEC envolvem o cromossomo 5, t(1;5), t(2;5) e t(5;12), pois no cromossomo 5 estão localizados vários genes que codificam interleucinas e fatores de crescimento relacionados com a proliferação e diferenciação de eosinófilos, entre eles o gene que codifica a interleucina-5.<sup>5</sup>

■ SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS/  
MIELODISPLASIAS (SMDs/MDs)

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) são distúrbios clonais que apresentam uma medula óssea

normocelular ou hipercelular (excepcionalmente hipocelular), displasias em pelo menos uma linhagem das células sanguíneas (diseritropoiese, disgranulopoiese, dismegacariocitopoiese) e uma ou mais citopenias no sangue periférico. Clinicamente, manifestam-se como citopenias persistentes e refratárias causadas pela presença de hematopoiese ineficaz, com possibilidade, em alguns casos, de evolução para leucemias agudas.<sup>11,47</sup>

De acordo com o grupo FAB, usando-se apenas características morfológicas do sangue periférico e da medula óssea, as SMDs são classificadas em cinco subtipos: 1) anemia refratária (AR – no inglês, *RA*); 2) anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA – no inglês, *RARS*); 3) anemia refratária com excesso de blastos (AREB – no inglês, *RAEB*); 4) anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t – no inglês, *RAEB-t*); 5) leucemia mielomonocítica crônica (LMMC – no inglês, *CMML*) (**Tabela 11.7**). No entanto, entre as neoplasias mieloides, talvez, as SMDs sejam as mais difíceis de serem caracterizadas, principalmente quando o número de blastos no sangue periférico e/ou na medula óssea não se encontra aumentado.<sup>6</sup> Por esse motivo, uma nova classificação, utilizando não apenas os achados morfológicos, mas também as características fenotípicas e citogenéticas proposta pela 4ª revisão da OMS de 2008, estabelecem critérios mínimos para diagnóstico dessa entidade (**Tabela 11.8**).<sup>8</sup>

TABELA 11.7 Critérios morfológicos para classificação FAB para as síndromes mielodisplásicas				
SUBTIPO	MEDULA ÓSSEA		SANGUE PERIFÉRICO	
	BLASTOS (%)	SIDEROBLASTOS EM ANEL (%)	BLASTOS (%)	MONÓCITOS
AR (RA)	< 5	< 15	< 1	-
ARSA (RARS)	< 5	≥ 15	< 1	-
AREB (RAEB)	5-20	-	< 5	-
AREB-t (RAEB-t)	> 20-30 e/ou bastonetes de Auer	-	≤ 5	-
LMMC (CMML)	≥ 20	-	< 5	> 1000/ $\mu$ L

TABELA 11.8 Achados clínicos no sangue periférico e na medula óssea nas síndromes mielodisplásicas		
ASPECTOS CLÍNICOS	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
Citopenia refratária com displasia em linhagem única (CRDU – no inglês, <i>RCUD</i> ): Anemia refratária (AR); neutropenia refratária (NR); trombocitopenia refratária (TR).	Monocitopenia/bicitopenia* Ausência de blastos ou presença de raros blastos (< 1%)**	Displasia em apenas uma linhagem: Disgranulopoiese ≥ 10% uma linhagem mieloide < 5% de blastos < 15% sideroblastos em anel
Anemia refratária com sideroblastos em anel – ARSA (no inglês, <i>RARS</i> )	Anemia Ausência de blastos	≥ 15% sideroblastos em anel Diseritropoiese apenas < 5% de blastos

(continua)



TABELA 11.8 Achados clínicos no sangue periférico e na medula óssea nas síndromes mielodisplásicas segundo OMS-2008 (continuação)		
ASPECTOS CLÍNICOS	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
Citopenia refratária com displasia em mais de uma linhagem (CRDM – no inglês, RCMD)	Citopenia(s) Ausência ou raros blastos (< 1%)** Ausência de bastonetes de Auer < 1.000 monócitos/μL	Disgranulopoiese ≥ 10% em 2 ou mais linhagens mieloides < 5% de blastos Ausência de bastonetes de Auer < ou > que 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB-1 – no inglês, RAEB-1)	Citopenia(s) < 5% de blastos** Ausência de bastonetes de Auer < 1.000 monócitos/μL	Displasia em 1 ou mais linhagem 5%-9% de blastos** Ausência de bastonetes de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB-2 – no inglês, RAEB-2)	Citopenia(s) 19% < blastos ≥ 5%*** Ausência ou presença de bastonetes de Auer*** < 1.000 monócitos/μL	Displasia em 1 ou mais linhagem 10-19% de blastos*** Ausência ou presença de bastonetes de Auer***
SMD inclassificável (SMD-I – no inglês, MSD-U)	Citopenias < 1% de blastos**	Displasia inequívoca menor que 10% em uma ou mais linhagem mielóide acompanhada de anormalidade citogenética típica para SMD < 5% de blastos
SMD associada com del 5(q) isolada	Anemia Contagem de plaquetas geralmente normal ou elevada Ausência ou raros blastos (< 1%)	Megacariócito normal ou aumentado com hipolobulação nuclear < 5% de blastos Citogenética del 5(q) isolada Ausência de bastonetes de Auer

\* Bicitopenia pode ser observada ocasionalmente. Casos com pancitopenia devem ser classificados como SMD inclassificável (SMD-I).  
\*\* Porcentagem de blastos na medula óssea < 5% e no sangue periférico entre 2 e 4% deve ser classificada como AREB-1. Casos de CRDU e CRDM com 1% de blastos no sangue periférico deve ser classificadas como SMD.  
\*\*\* Devem ser classificados como RAEB-2: casos com bastonetes de Auer e < 5% de blastos no sangue periférico e < 10% na medula óssea; casos com apenas 19% < blastos > 5% no sangue periférico; casos com blastos < 5% no sangue periférico e bastonetes de Auer ou 19% < blastos ≥ 10% na medula óssea ou ambos; casos com < 10% de blastos na medula óssea com bastonetes de Auer e/ou 5 a 19% de blastos no sangue periférico.  
Fonte: Vardman colaboradores.<sup>8</sup>

As displasias de células sanguíneas presentes na SMD podem ser vistas tanto na medula óssea quanto no sangue periférico e se caracterizam por apresentar:

- **Disgranulopoiese:** Neutrófilos com núcleos hipersegmentados; hipolobulação dos neutrófilos – anomalia de Pelger-Hüet adquirida (pseudo Pelger-Hüet); granulócitos hipogranulares; pseudo Chediak-Higashi e bastonetes de Auer;
- **Diseritropoiese:** Eritroblastos multinucleados, núcleos em trevo, aspectos megaloblastóides, pontes internucleares, cariorréxis e grânulos de ferro mitocondrial perinuclear (sideroblastos em anel);
- **Dismegacariocitopoiese:** Megacariócitos hipolobulados; vacuolizações citoplasmáticas e micromegacariócitos.

A anemia é um achado presente em praticamente todos os casos, com contagem de reticulóci-

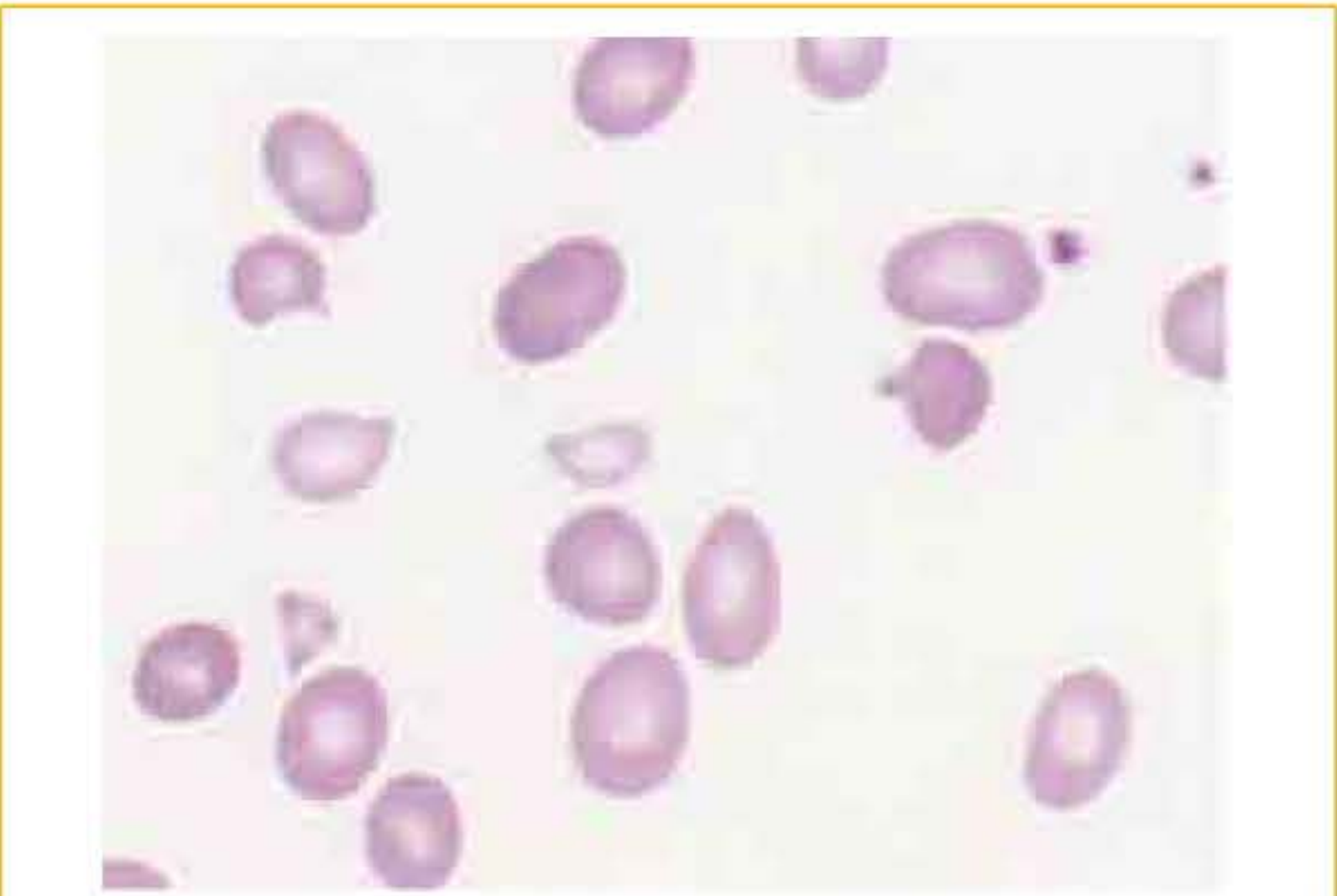
tos baixa (anemia hiporregenerativa), sendo, na maioria das vezes, normocítica e normocrômica, podendo, no entanto, ser macrocítica. Nesse último caso, deve ser realizado o diagnóstico diferencial com a anemia megaloblástica (também apresenta anemia macrocítica com pancitopenia) por meio da dosagem de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>. Podem ser comuns no esfregaço sanguíneo de sangue periférico o dimorfismo eritrocitário (eritrócitos macrocíticos, normocíticos e microcíticos hipocrômicos), a pecilocitose (a presença de eliptócitos, dacriócitos, estomatócitos, acantócitos e esquizócitos) e as inclusões eritrocitárias (ponteados basófilos e corpúsculos de Howell-Jolly) (**Figuras 11.23 e 11.24**).

A leucopenia ocorre à custa de neutropenia, podendo ser encontrados precursores mielóides como mieloblastos contendo ou não bastonetes de Auer, mielócitos, porém, geralmente abaixo de 5% (**Figura 11.25**). Neutrófilos (outros granulócitos, principalmente eosinófilos) hipogranulares são os achados displásicos mais comuns nessas células

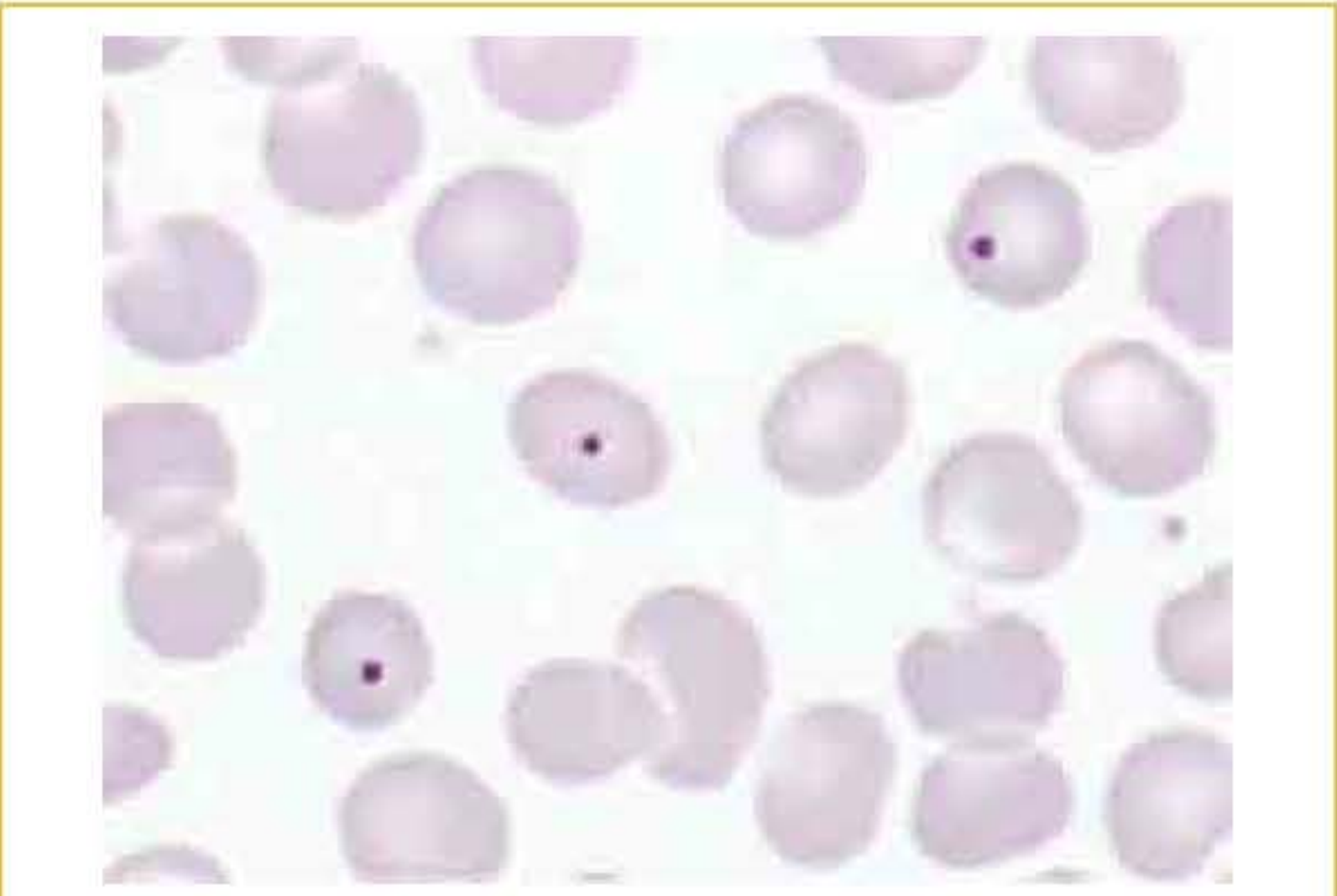


(Figura 11.26). A presença de bastonete de Auer caracteriza o grupo de RAEB-t (classificação FAB) ou RAEB-2.<sup>8,11</sup>

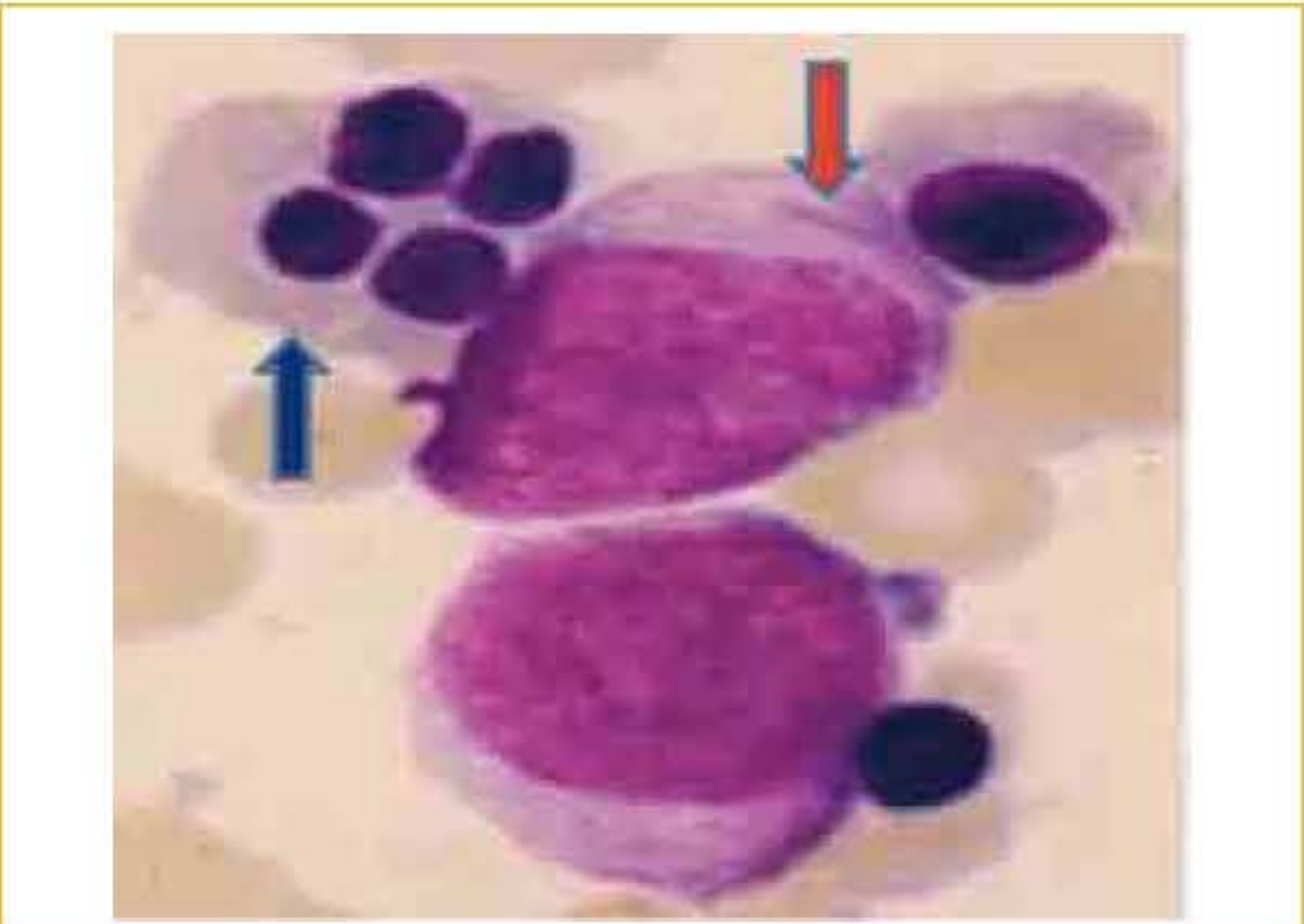
A trombocitopenia isolada é rara, sendo um achado conjunto com anemia e/ou neutropenia. A presença de trombocitose está associada, normalmente, a del5(q).<sup>8</sup>



**FIGURA 11.23** Dimorfismo eritrocitário. Esfregaço de sangue periférico (MGG).



**FIGURA 11.24** Corpúsculos de Howell-Jolly.

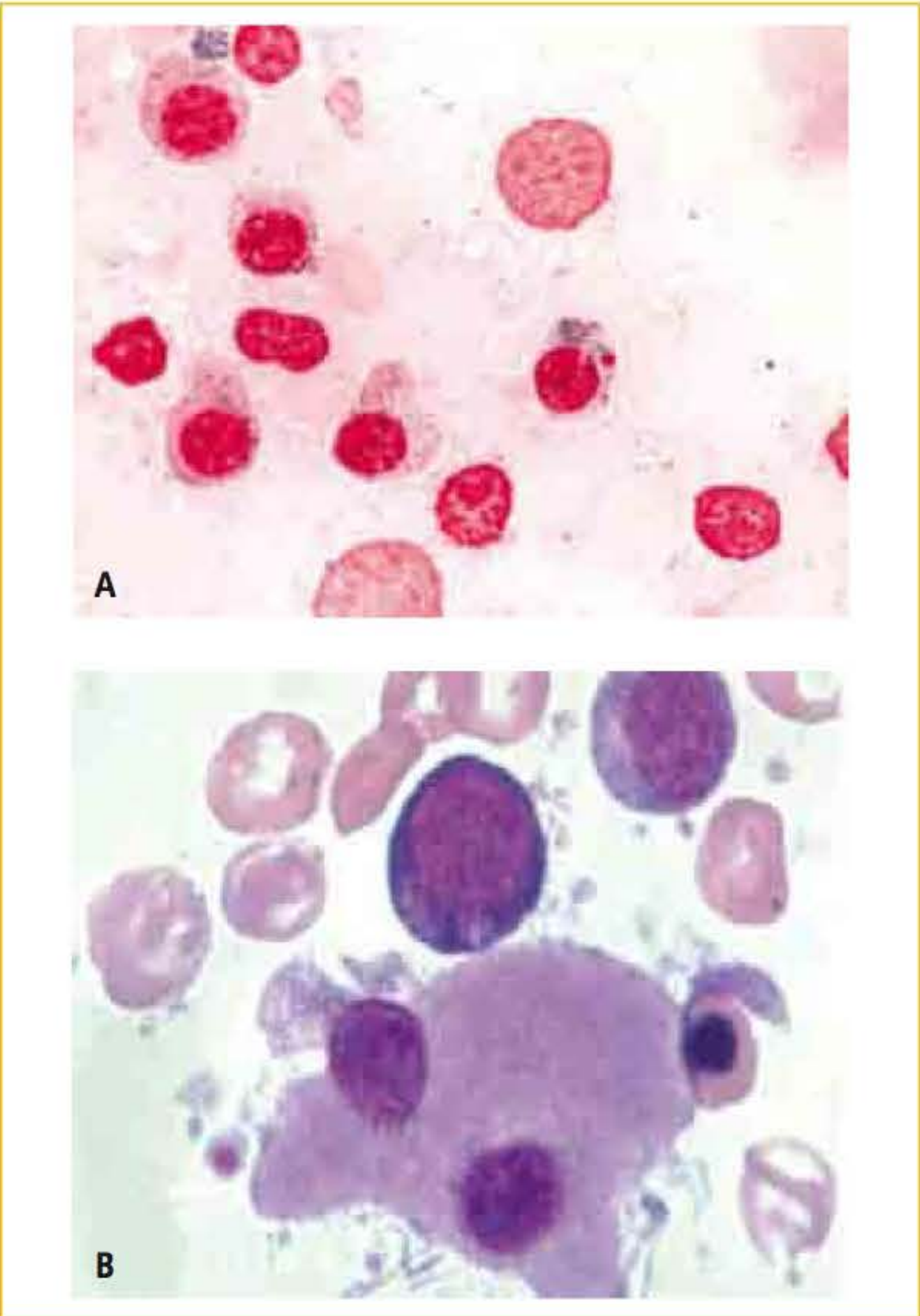


**FIGURA 11.25** Eritroblasto com quatro núcleos (seta azul). Mieloblastos, com bastonete de Auer (seta vermelha).



**FIGURA 11.26** Neutrófilo hipogranular. Anisopeilocitose. Esfregaço de sangue periférico (MGG).

Para análise da morfologia da medula óssea (mielograma) e da avaliação dos sideroblastos em anel, podem ser utilizadas as colorações hematológicas de rotina (Wright-Giemsa ou May-Grünwald Giemsa) e azul da Prússia (coloração de Perls), respectivamente (Figura 11.27).



**FIGURA 11.27** (A) Sideroblastos em anel: depósito de ferro mitocondrial, coloração de Perls (pontos azulados nos eritroblastos – seta). (B) Megacariócito hipobulbado, medula óssea.



A incidência é de aproximadamente 1,3-5 casos/ano/100 mil habitantes na população geral e 30 casos/ano/100 mil habitantes em pessoas acima de 70 anos, determinando claramente uma prevalência dessa neoplasia em pessoas com idade mais avançada. É uma doença geralmente de evolução lenta, cujo prognóstico baseia-se principalmente nos achados citogenéticos, de acordo com dois grandes grupos: IPSS (International MDS Risk Classification Survival) e WPSS (World Health Organization – classification-based Prognostic Scoring System)<sup>25</sup> (Tabelas 11.9 a 11.11).

:: SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS/NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (SMD/NMP)

As SMDs/NMPs são distúrbios clonais envolvendo células de origem mieloide, sendo que a apresentação clínica e os achados laboratoriais e morfológicos, no início da doença, determinam a característica mista desse subgrupo. Estão compreendidos

nesse grupo a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), leucemia mieloide crônica *BCR-ABL* negativo ou atípica (LMCa), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) e as síndromes mielodisplásicas/neoplasias mieloproliferativas não classificáveis (SMD/NMP-nc), sendo que o distúrbio que melhor caracteriza esse último grupo é a anemia refratária com sideroblastos em anel associada com intensa trombocitose (ARSA-T).<sup>25</sup>

Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)

A LMMC é um distúrbio de baixa incidência (aproximadamente 1 caso/100 mil pessoas/ano), com predomínio na faixa etária de aproximadamente 70 anos. Entre os achados laboratoriais e morfológicos típicos do sangue periférico e da medula óssea, a apresentação clínica mais comum inclui leucocitose, monocitose (Figura 11.28), *BCR-ABL* negativo, além de hepatoesplenomegalia nos pacientes com contagem de leucócitos geralmente mais elevada (Quadro 11.11).

TABELA 11.9 Critérios prognósticos	
PROGNÓSTICO	CRITÉRIOS
Bom prognóstico	Normal -Y Del 5(q) e del 20(q) isoladas
Prognóstico intermediário	Demais anormalidades
Prognóstico desfavorável	Complexo Monossomia 7 Del 7(q)

Fonte: Cazzola e colaboradores.<sup>25</sup>

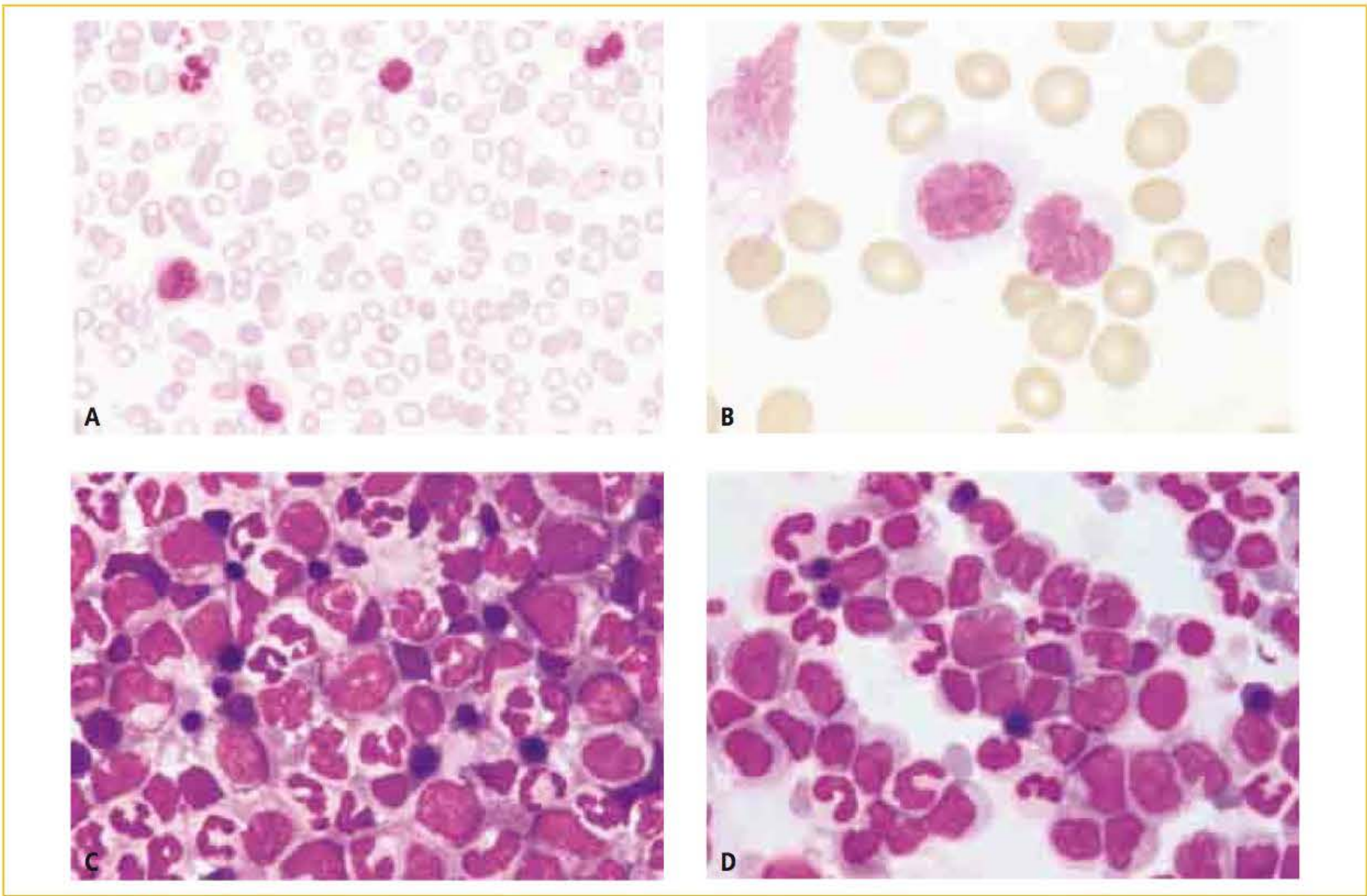
TABELA 11.10 Escore WPSS				
ESCORE	0	1	2	3
OMS	AR ARSA del 5(q)	CRDM	AREB-1	AREB-2
Cariótipo	Bom	Intermediário	Desfavorável	Desfavorável
Transfusão	Não	Sim	Não	Não

Fonte: Cazzola e colaboradores.<sup>25</sup>

TABELA 11.11 Relação escore WPSS e tempo de sobrevida		
	ESCORE	SOBREVIDA (MESES)
Muito baixo	0	141
Baixo	1	96
Intermediário	2	46
Alto	3-4	26
Muito alto	5-6	9

Fonte: Cazzola e colaboradores.<sup>25</sup>





**FIGURA 11.28** Aspectos celulares e morfológicos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LMMC. (A) Esfregaço de sangue periférico com monocitose e sem atipia de monócitos (coloração MGG – 400x); (B) Esfregaço de sangue periférico com monócitos apresentando anormalidades citoplasmáticas (coloração MGG – 1250x); (C) Esfregaço de medula óssea mostrando intensa celularidade, hiperplasia da série granulocítica e contagem de blastos inferior a 10% – LMMC-1 (coloração MGG – 1.000x); (D) Esfregaço de medula óssea apresentando hiperplasia monocitoide (monócitos e seus precursores), com contagem de blastos e pró-monócitos de 18% – LMMC-2 (coloração MGG – 1.000x).

Fonte: Cazzola e colaboradores.<sup>25</sup>

**QUADRO 11.11** Critérios para diagnóstico de LMMC

- Monocitose persistente no sangue periférico (> 1.000 monócitos/ $\mu$ L)
- *BCR-ABL* negativo
- Ausência de anormalidades envolvendo *PDGFRA* ou *PDGFRB* (a presença de uma dessas anormalidades, com eosinofilia associada, exclui LMMC)
- Presença de blastos no SP e na MO inferior a 20% (inclui mieloblastos, monoblastos ou pró-monócitos). LMMC-1: < 5% (SP) e 10% (MO); LMMC-2: 5-19% (SP) e 10-19% (MO) ou presença de bastonetes Auer, independentemente da contagem de blastos
- Pelo menos 1 dos 3 critérios a seguir:
  - displasia em uma ou mais linhagens;
  - anormalidades clonais citogenéticas ou moleculares adquiridas em células hematopoiéticas;
  - monocitose persistente, sem causa aparente (infecção, inflamação ou malignidade) por pelo menos três meses.
- Contagem de leucócitos: < 13.000/ $\mu$ L – mielodisplasia-like; > 13.000/ $\mu$ L – mieloproliferativas-like\*

\* Esses são valores arbitrários; no entanto, representam importante fator prognóstico.  
*PDGFRA*, receptor para fator de crescimento derivado de plaqueta- $\alpha$ ;  
*PDGFRB*, receptor para fator de crescimento derivado de plaqueta- $\beta$ .  
Fonte: Adaptado de Vadman.<sup>48</sup>

**Anormalidades e características citogenéticas e moleculares na LMMC**

Os aspectos citogenéticos presentes em pacientes portadores de LMMC possuem importante valor agregado quando se observa o comportamento da doença, levando-se em conta a sobrevida e a progressão para leucemia mieloide aguda (LMA). Até recentemente, a anormalidade molecular mais conhecida, vista em aproximadamente um terço dos pacientes, eram as mutações envolvendo o gene *RAS* (*NRAS* ou *KRAS*), mas sem valor significativo com relação à patogênese e ao prognóstico.<sup>7</sup> No entanto, nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias tem permitido a identificação de novas mutações gênicas em um número significativo de pacientes portadores de LMMC, entre as quais as dos genes *TET2*, *CBL*, *ASXL1*, *RUNX1* e *EZH2*. Os dois primeiros estão mais associados à proliferação clonal mielomonocítica, e os demais,



à progressão da doença (**Quadro 11.12**). Estudos recentes também têm demonstrado que a redução na expressão do gene *TIF1G* (Fator Intermediário de Transcrição-1 Gama) pode representar um mecanismo patogênético da LMMC.<sup>49</sup>

**QUADRO 11.12** Principais mutações somáticas com relevância clínica em pacientes com leucemia mielomonocítica crônica associadas ao tipo morfológico e ao prognóstico da doença

- **TET2** – Aproximadamente 40-50% dos pacientes com LMMC possuem essa mutação. Traduz dominância clonal mielomonocítica
- **CBL** – Mutação também associada à dominância clonal mielomonocítica. Sem evidências de associação com progressão ou prognóstico
- **ASXL1** – Mutação presente em um grande número de pacientes com LMMC. Evidências de relação com mau prognóstico e com progressão para LMA
- **RUNX1** – Mutação encontrada em 25% dos pacientes com LMMC. Evidências de relação com progressão para LMA
- **EZH2** – Mutação associada com mau prognóstico
- **NRAS/KRAS** – Sem significado para prognóstico clínico

Fonte: Hoffman e colaboradores.<sup>4</sup>

Análises de anormalidades cromossômicas e de mutações gênicas multivariadas igualmente têm desempenhado importante papel na avaliação da sobrevida e da progressão para LMA. A partir dessas

alterações cromossômicas e gênicas, permite-se, atualmente, revelar três situações citogenéticas que determinam também três categorias de risco: a) baixo risco considera aqueles pacientes com cariótipo normal ou deleção do cromossomo Y como única anormalidade; b) alto risco está associado à presença de trissomia do cromossomo 8, anormalidades no cromossomo 7 ou cariótipo complexo; c) risco intermediário está relacionado com outras anormalidades. Nesse espectro, a sobrevida média de pacientes distribuídos nesses três subgrupos é de 37, 11 e 18 meses, respectivamente.

**Diagnóstico da LMMC**  
O diagnóstico da LMMC envolve vários parâmetros observacionais, incluindo avaliação do esfregaço do sangue periférico, aspirado (mielograma) e biópsia de medula óssea e análise citogenética e molecular.  
No sangue periférico, observa-se uma monocitose persistente, com contagem de monócitos superior a 1.000/ $\mu$ L. Blastos e outros precursores mieloides também podem estar presentes (mieloblastos, monoblastos e pró-monócitos); a quantidade dessas células determina dois subgrupos, denominados de LMMC-1 (blastos < 10%) e LMMC-2 (blastos > 10% e < 20%). A presença de disgranulopoiese também é achado obrigatório como critério diagnóstico (**Tabela 11.12**).

TABELA 11.12 Critérios diagnósticos da leucemia mielomonocítica crônica <sup>18</sup>		
AVALIAÇÃO	ACHADOS	TIPO DE RECOMENDAÇÃO
Sangue Periférico	Monócitos > 1000/ $\mu$ L Presença de disgranulopoiese (é critério diagnóstico) Contagem de blastos (mieloblastos, monoblastos e pró-monócitos) – diferenciação entre LMMC-1 (blastos < 10%) e LMMC-2 (blastos > 10% e < 20%) Precursos neutrofílicos: LMMC < 10% LMC > 10%	Obrigatório
Medula Óssea	Displasia em uma ou mais células da linhagem mieloide Contagem de blastos (mieloblastos, monoblastos e pró-monócitos) – diferenciação entre LMMC-1 e LMMC-2	Obrigatório
BCR-ABL negativo	Exclusão de LMC	Obrigatório
PDGFRA ou PDGFRB rearranjo	Exclusão de neoplasias mieloides e linfoides com presença de eosinofilia	Obrigatório na presença de eosinofilia
Biópsia de medula óssea	Pesquisa CD34+, avaliação da celularidade, fibrose Exclusão de outros distúrbios com presença de monocitose	Recomendado
Citogenética	Pesquisa de anormalidades cromossômicas adquiridas associadas ao diagnóstico e prognóstico	Recomendado
Imunofenotipagem	Confirmação de linhagem monocítica (CD33+/CD13+) em células do sangue periférico e medula óssea Pesquisa de CD56+	Sugerido
FISH	Pesquisa de anormalidades cromossômicas 8-, 7-, del (7q)	Sugerido
Análise de mutação em genes candidatos	Pesquisa de mutações somáticas que permitam conclusão diagnóstica e prognóstica	TET2, CBL, ASXL1, RUNX1, EZH-2



As alterações citogenéticas clonais ou mutações somáticas presentes em células mieloides confirmam o diagnóstico de LMMC, sendo que devem ser obrigatoriamente *BCR-ABL* negativos. Por outro lado, a ausência de anormalidades clonais determina diagnóstico incerto, especialmente nos casos de LMMC-1, em que a contagem de blastos, tanto no sangue periférico como na medula óssea, é baixa (inferior a 10%) (**Tabela 11.12**).<sup>25</sup>

Germing e colaboradores,<sup>4,35</sup> analisando pacientes com LMMC-1 e LMMC-2, evidenciam sobrevida média de 20 e 15 meses, respectivamente, e risco de progressão para LMA maior nos pacientes do segundo grupo (LMMC-2). Such e colaboradores<sup>50</sup> identificaram vários fatores prognósticos laboratoriais, como número de blastos no sangue periférico e na medula óssea, contagem global de leucócitos (WBC, do inglês *white blood cell count*), concentração da hemoglobina, contagem de plaquetas e risco citogenético específico para LMMC, independentemente da clínica<sup>50</sup> (**Quadro 11.13**).

**QUADRO 11.13** Fatores prognósticos laboratoriais independentes na leucemia mielomonocítica crônica

- **Blastos** – Diagnóstico diferencial entre LMMC-1 (< 10%) e LMMC-2 (10-19%)
- **WBC** – Diagnóstico diferencial entre mielodisplasias-like (< 13.000/μL) e mieloproliferativas-like (> 13.000/μL)
- **Hemoglobina** – Anemia grave pode estar envolvida com expansão clonal e consequente progressão da doença
- **Plaquetas** – Trombocitopenia pode estar envolvida com expansão clonal e consequente progressão da doença
- **Risco citogenético específico LMMC** – Anormalidade no cromossomo 7 e cariótipo complexo – mau prognóstico

Fonte: Such e colaboradores.<sup>50</sup>

**Leucemia mieloide crônica atípica – BCR-ABL 1 negativo (LMCa)**

A incidência da LMCa é muito rara, aproximadamente 1 caso/1 milhão/pessoas/ano, quando comparada com outras SMDs/NMPs, principalmente a LMMC. As manifestações clínicas mais comuns incluem sintomas sistêmicos, na maioria das vezes associados à falha medular e esplenomegalia. Basicamente, pode-se observar no esfregaço do sangue periférico leucocitose à custa de neutrofilia, disgranulocitopoiese, presença de granulócitos imaturos e precursores eritroides (reação leucoeritroblástica) (**Figura 11.29**). Verifica-se ainda, ao

analisar os achados descritos, que o diagnóstico diferencial poderá ser necessário entre LMCa, fase inicial hiperclular da mielofibrose e leucemia neutrofílica crônica (LNC) e que a conclusão pode ser, muitas vezes, muito difícil. Nesses casos, um importante valor agregado é a ausência das mutações *JAK2* e *MPL* na LMCa, porém presentes e fazendo parte das principais causas genéticas nas NMPs. Já no diagnóstico diferencial da LNC, a proporção de neutrófilos imaturos na circulação pode ser fator decisivo, sendo maior que 10% na LMCa e menor que 10% na LNC.<sup>25</sup>

Em aproximadamente um terço dos portadores de LMCa, pode ser encontrada a mutação *TET2*, em 8%, a mutação *CBL* e em 13%, *EZH2*, todas típicas da LMMC (**Quadro 11.12**), confirmando a possibilidade de sobreposição das duas entidades. Um importante passo a ser esclarecido é a identificação da mutação gênica responsável pela presença de precursores mieloides no sangue periférico, característica essa típica da LMCa e ausente na LMMC.<sup>25,51-53</sup>

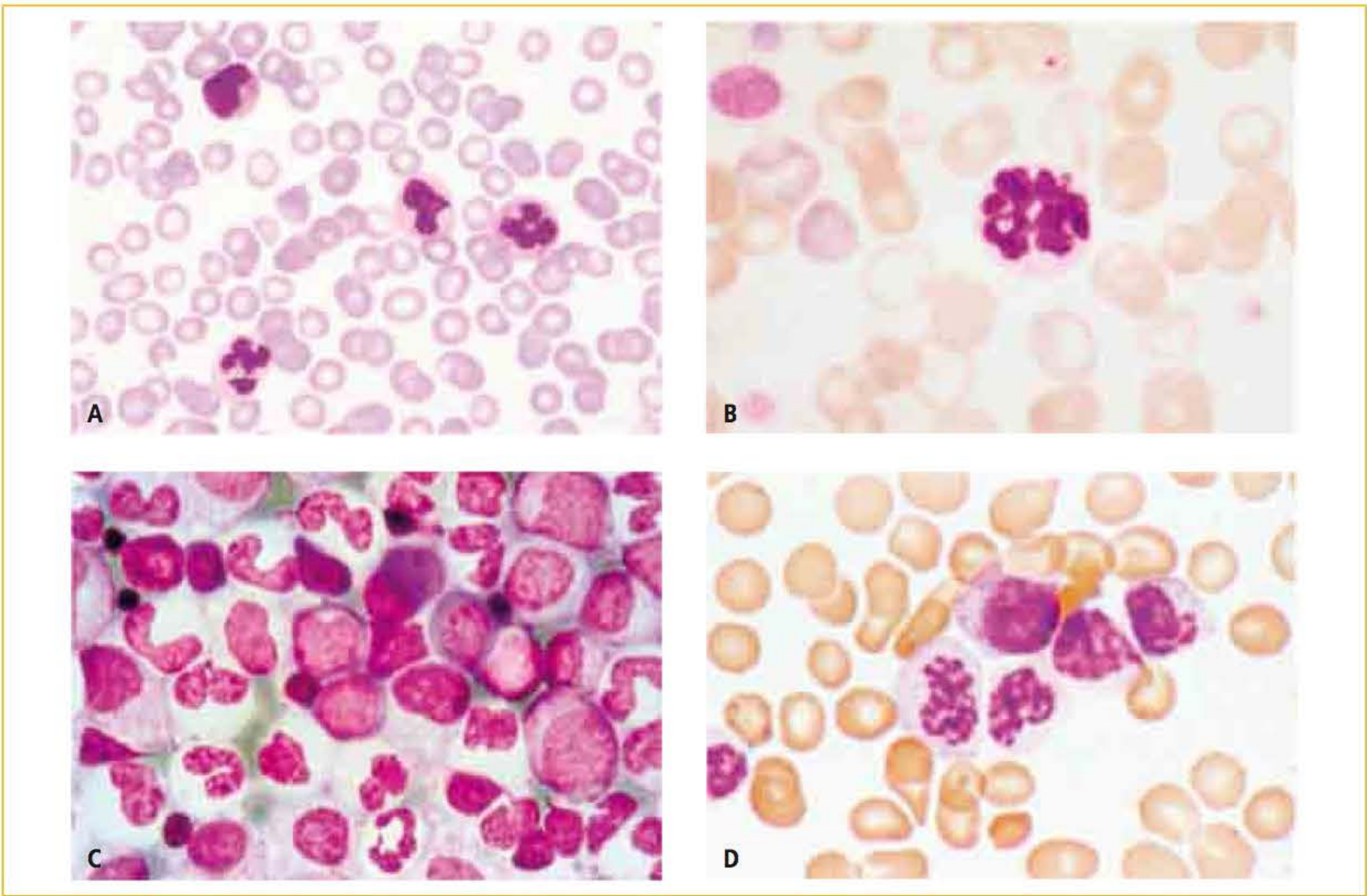
Análises multivariadas determinaram como fatores prognósticos independentes, quanto à sobrevida, idade, concentração da hemoglobina e leucometria global (**Quadro 11.14**).<sup>54,55</sup> A associação de idade maior que 65 anos e leucometria acima de 50.000 leucócitos/μL demonstrou, em estudo recente, redução da sobrevida, dependência de transfusões sanguíneas, predição de esplenomegalia e transformação leucêmica.<sup>54</sup>

**QUADRO 11.14** Fatores prognósticos independentes associados à sobrevida na LMCa

- Idade superior a 65 anos
- Hemoglobina < 10 g/dL
- Leucometria global > 50.000 leucócitos/μL

Podem ser encontradas variantes na LMCa: a) síndrome da condensação cromatínica anormal, (SCCA, do inglês *syndrome abnormal chromatin clumping*), a qual apresenta intensa condensação cromatínica em núcleos de neutrófilos e de eritroblastos (**Figura 11.29D**). Embora seja uma variante, o comportamento não tem mostrado diferente prognóstico ou desfecho; b) SMD/NMP associada a t(8;9)(p22;p24). Ocorre a fusão entre os genes *JAK2* e *PCMI* e, ainda que muitos desses casos apresentem eosinofilia intensa, sendo classificados como leucemia eosinofílica crônica, metade deles possui um quadro típico de LMCa.<sup>56</sup>





**FIGURA 11.29** Sangue periférico e medula óssea de pacientes com LMCa, BCR-ABL negativo. (A) Esfregaço de sangue periférico mostrando leucocitose, metamielócitos (acima), neutrófilos displásicos (abaixo e à esquerda) (coloração MGG/400x). (B) Sangue periférico: polilobócitos (centro); eritrócito com inclusão citoplasmática – corpúsculos de Howell-Jolly (acima); plaquetas gigantes e eritrócitos com policromatofilia (esquerda) (coloração de MGG/1.250x). (C) Aspirado de medula óssea com hiperplasia granulocítica e hipoplasia eritroide; neutrófilos maduros agranulares e com anormalidades de segmentação (coloração MGG – 640x). (D) Síndrome da condensação cromatínica anormal; sangue periférico com leucocitose, granulócitos imaturos e neutrófilos com condensação cromatínica anormal (coloração MGG – 1.250x).

Fonte: Cozzola e colaboradores.<sup>25</sup>

Portanto, o prognóstico e a sobrevida de pacientes com LMCa são pobres, não havendo, até o momento, medicamentos que determinem uma mudança no desfecho desses pacientes. Por esse motivo, o transplante de medula óssea alogênico pode ser uma alternativa, desde que possível.

**Anemia refratária com sideroblastos em anel associada à intensa trombocitose (ARSA-T)**

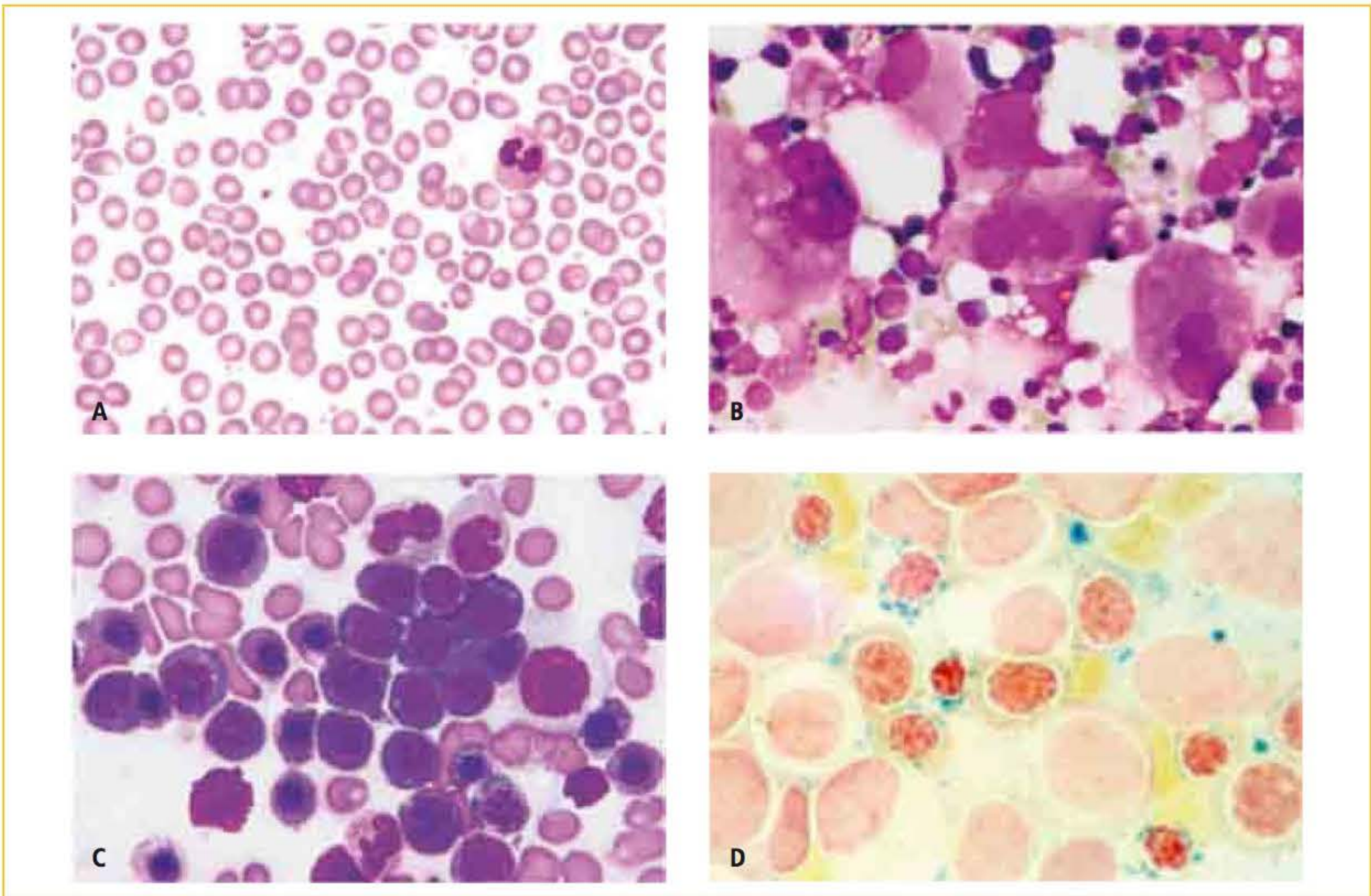
Essa neoplasia, embora possua características de uma anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), ou seja, uma SMD, difere dessa por apresentar uma trombocitose intensa e persistente. Deve ser distinguida primariamente da TE e da ARSA; a primeira não apresenta sideroblastos em anel na medula óssea, e a segunda não versa com

trombocitose. Somente esses dois critérios já podem ser considerados suficientemente confiáveis para o diagnóstico de ARSA-T (**Quadro 11.15**). Aspectos morfológicos do sangue periférico e da medula óssea em pacientes com ARSA-T podem ser vistos na **Figura 11.30**.<sup>25</sup>

QUADRO 11.15 Critérios diagnósticos da OMS para diagnóstico de ARSA-T
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Anemia refratária associada à diseritropoiese e 15% ou mais de sideroblastos em anel (MO)</li><li>▪ Menos de 5% de blastos (MO)</li><li>▪ Contagem de plaquetas igual ou maior que 450.000/μL</li><li>▪ Presença de megacariócitos atípicos, similar ao observado na NMP BCR-ABL negativo/TE</li><li>▪ Ausência das seguintes alterações cromossômicas: del(5q), t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21;q26)</li></ul>

Fonte: Cozzola e colaboradores.<sup>25</sup>



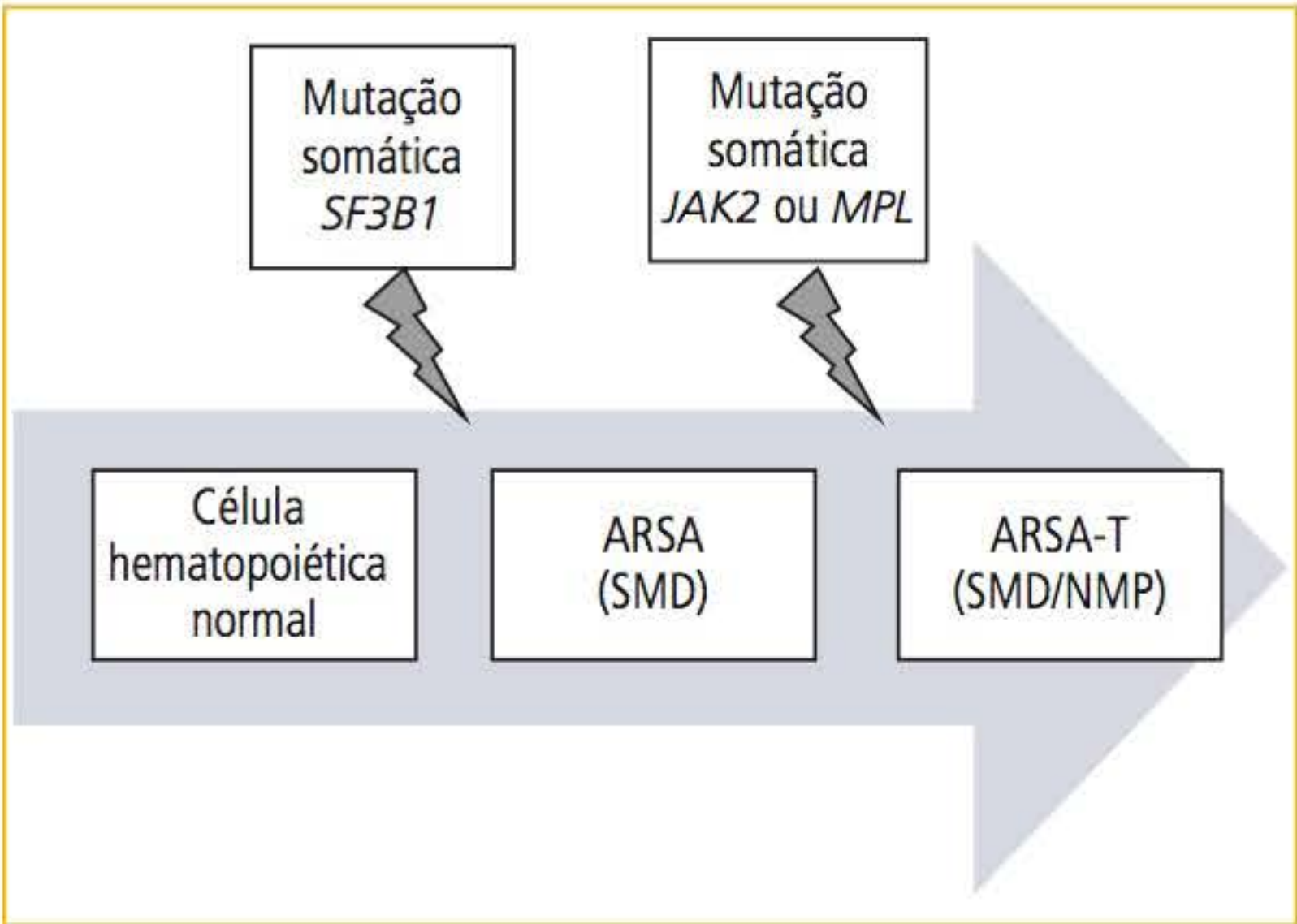


**FIGURA 11.30** Aspectos morfológicos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com ARSA-T. (A) SP com trombocitose (coloração MGG – 1.000x). (B) MO com megacariócitos atípicos (coloração MGG/500x). (C) MO mostrando hiperplasia eritroide megaloblástica (coloração MGG – 1.000x). (D) MO com sideroblastos em anel (coloração de azul da Prússia – Perls – 1.000x).

Fonte: Cozzola e colaboradores.<sup>25</sup>

Aspectos citogenéticos e moleculares na ARSA-T

O que se observa na ARSA-T, como na ARSA, é uma elevada expressão de ALAS2 (ácido delta-aminolevulínico sintase-2) e uma diminuição do ABCB7 (*ATP binding cassette transporter*) em células CD34-. Alguns estudos demonstraram que de 58 a 79% dos pacientes com ARSA-T carregam mutação *JAK2* ou *MPL* em granulócitos circulantes, mutações essas ausentes em pacientes com ARSA. Mutações *TET2* também foram encontradas em alguns casos, e alguns deles associados à mutação *JAK2* (V617F), determinando, de forma substancial, o caráter ambíguo dessa entidade, ou seja, características mielodisplásicas e mieloproliferativas, concomitantes, tanto em nível molecular quanto morfológico. Esses fatos também sugerem que a ARSA-T pode se desenvolver a partir de uma ARSA após a aquisição de uma mutação somática *JAK2*, *MPL* ou qualquer outra ainda não observada<sup>57-59</sup> (**Figura 11.31**).



**FIGURA 11.31** Patogênese da ARSA-T. Combinação das mutações *SF3B1* e *JAK2* ou *MPL*. A mutação *SF3B1* (fator de *splicing* de RNA 3B, subunidade 1) provoca sobrecarga de ferro, eritropoiese ineficaz, anemia e diseritropoiese na ARSA. Subsequente sobreposição da mutação somática adquirida *JAK2* ou *MPL* inclui aspectos mieloproliferativos, entre os quais trombocitose.

Fonte: Cozzola e colaboradores.<sup>25</sup>



## LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS (LMAS)

As LMAs compõem um grupo de doenças neoplásicas que se desenvolvem na medula óssea, podem ocorrer em qualquer idade, tendo, no entanto, uma maior incidência em adultos.

Apresentam características clínicas semelhantes, embora as causas citogenéticas e morfológicas sejam diferentes, pois a linhagem e o grau de maturação/diferenciação das células mieloides afetadas são variáveis.<sup>11</sup> A proliferação blástica leucêmica na medula óssea é um achado comum, determinando substituição e supressão do tecido hematopoiético normal, com consequentes citopenias no sangue periférico (anemia, trombocitopenia e neutropenia, entre outras), as quais são responsáveis pelas principais manifestações clínicas da doença.<sup>11</sup> A análise do aspirado de medula óssea exhibe, na maioria dos casos, um aspecto hipercelular com a contagem de blastos superior a 20%. Excepcionalmente, a medula óssea pode ser hipocelular; no entanto, a proliferação blástica está presente. Megacariócitos estão diminuídos ou ausentes.

Nos últimos anos, muitas ferramentas têm sido agregadas para o diagnóstico das leucemias agudas. Entretanto, a porcentagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea (20% ou mais) permanece ainda, na prática, a principal delas. A determinação da quantidade de blastos deve vir, preferencialmente, de uma contagem de pelo menos 200 células no sangue periférico e 500 células na medula óssea, utilizando-se os critérios de identificação dessas células propostos pelo International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome – IWGMMS. A substituição da avaliação morfológica visual da lâmina corada pela citometria de fluxo, utilizando o CD34 como marcador, não é recomendada pelo fato de que nem todos os blastos leucêmicos expressam esse marcador e ainda porque hemodiluição e outros artefatos podem produzir resultados equivocados.<sup>5,6</sup> Porém, em algumas situações específicas, pela presença de anormalidades genéticas, o diagnóstico pode ser firmando independentemente da contagem de blastos.<sup>6</sup> Algumas mutações gênicas já estão devidamente reconhecidas como causas de LMAs, tais como *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3*, *RUNX1*, *KIT*, *WT1* e *GATA* na associação com a trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down).<sup>8</sup>

Uma leucemia mieloide aguda pode ser primária, ou seja, sem uma doença tumoral hemato-

lógica prévia, ou oriunda de alguma neoplasia mieloide (mielodisplasias e neoplasias mieloproliferativas). A presença de doença extramedular é um achado bastante comum (infiltração de órgãos e tecidos como baço, fígado, hiperplasia gengival, pele e sistema nervoso central, entre outros) e, em grande parte das vezes, nessa situação, o prognóstico é reservado. A instalação pode ser rápida ou insidiosa.<sup>8</sup>

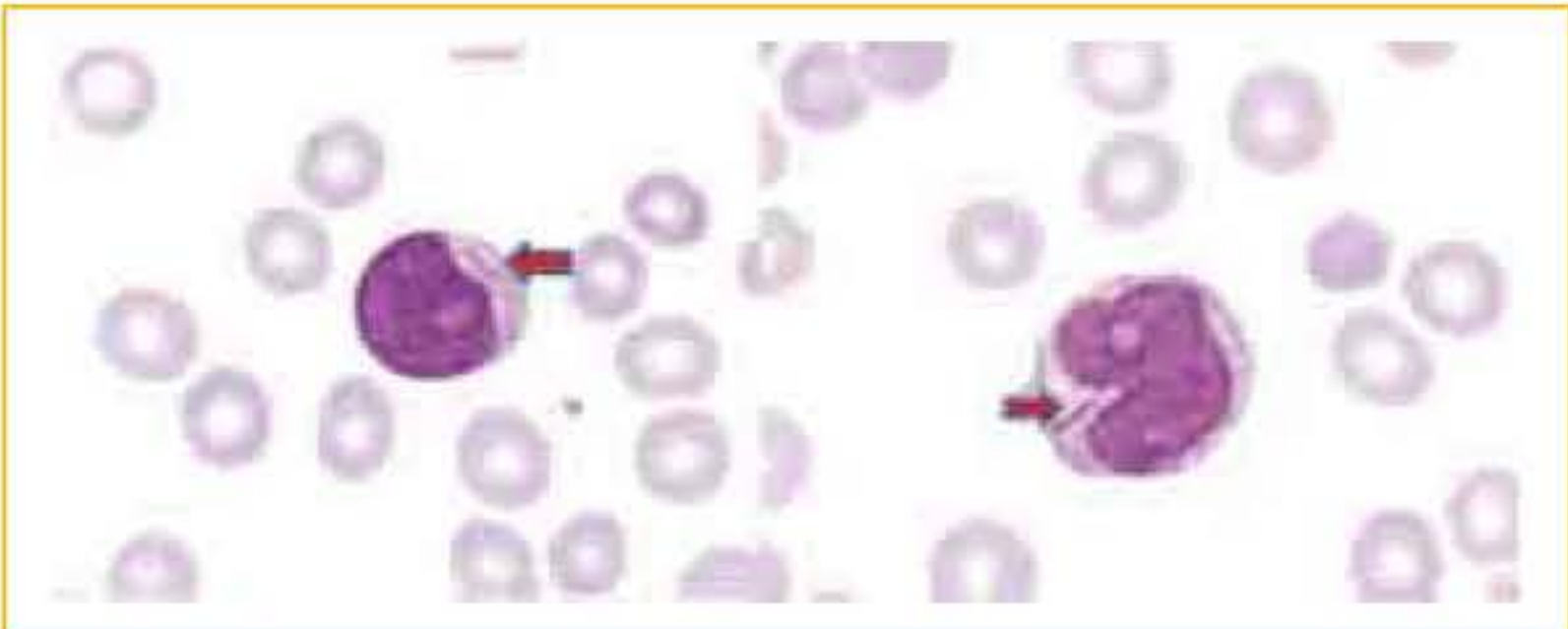
A análise citogenética e a imunofenotipagem para o estabelecimento do cariótipo e identificação da linhagem e do grau de maturação/diferenciação da célula afetada, respectivamente, são indispensáveis, pois estão associadas diretamente com o tratamento, prognóstico e acompanhamento dos pacientes.<sup>8</sup> As metodologias mais utilizadas para esse fim, além do cariótipo convencional, são a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e/ou hibridização fluorescente *in situ* (FISH), uma vez que essas duas permitem detectar anormalidades submicroscópicas não demonstráveis pelo método citogenético convencional.<sup>8</sup>

Os principais sinais e sintomas clínicos que possam indicar a hipótese de uma leucemia mieloide aguda são febre, sangramentos (do tipo epistaxe, petéquias e equimoses) e sinais de anemia (cansaço e prostração, entre outros), constituindo a tríade de base para essas doenças. Laboratorialmente, a tríade inicial para as leucemias agudas, independentemente da presença de blastos no sangue periférico, é anemia, neutropenia e trombocitopenia. Portanto, todas as vezes que um hemograma apresente esses achados, não deve ser descartada a possibilidade de uma leucemia aguda, em uma fase pré-leucêmica ou subleucêmica, ou seja, fase em que a doença já se encontra instalada na medula óssea, porém, sem a presença de blastos circulantes. Nessa situação, o exame da medula óssea torna-se obrigatório para o diagnóstico definitivo.

A anemia, habitualmente, é normocítica e normocrômica ou hiporregenerativa. A presença de eritroblastos no sangue periférico é um achado comum.<sup>5</sup> A trombocitopenia, geralmente, está presente ao diagnóstico, com contagem abaixo de 50.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ , em aproximadamente 50% dos casos. A contagem global de leucócitos encontra-se, geralmente, acima de 25.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$ , porém abaixo de 100.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$ . No entanto, leucocitose acima de 100.000 leucócitos/ $\mu\text{L}$



pode ocorrer, como também contagem de leucócitos dentro dos valores de referência e, em situações menos comuns, leucopenia.<sup>5</sup> A presença de blastos é variável, sendo, no entanto, maior que 20% na contagem diferencial, podendo chegar, em alguns casos, a 90% ou mais. Um achado hematológico possível é a presença, especificamente nos blastos e pró-mielócitos, de bastonetes de Auer, que são estruturas citoplasmáticas na forma de bastões e de coloração púrpura, derivadas dos grânulos azurrófilos (grânulos ricos em mieloperoxidase) e, portanto, caracterizam a origem mieloide desses blastos (**Figura 11.32**).



**FIGURA 11.32** Inclusões citoplasmáticas na forma de bastonetes e de coloração púrpura denominadas de bastonetes de Auer (setas).

A classificação atualmente mais aceita para as leucemias mieloides agudas é aquela proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) – 2008,<sup>8</sup> na qual são considerados os achados morfológicos, citogenéticos e imunofenotípicos para a estratificação ou o agrupamento dessas doenças (**Quadro 11.16**).

À medida que as anormalidades genéticas foram sendo conhecidas e incorporadas nos estudos das leucemias agudas, permitiu-se estabelecer a relação dessas alterações com os achados clínicos e morfológicos, com o comportamento da doença e com a avaliação prognóstica de remissão e sobrevida. Dessa forma, apesar do diagnóstico inicial desse grupo de doenças ser ainda dependente de achados morfológicos no hemograma e na medula óssea, a classificação dessas doenças tem sofrido modificações importantes, observando-se cada vez mais, os aspectos genéticos em detrimento dos achados morfológicos. Esse fato também tem possibilitado melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nessas neoplasias e, como consequência, a disponibilização de novos recursos terapêuticos, tendo em vista o reconhecimento de alvos moleculares específicos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Por esse motivo, a

**QUADRO 11.16** Classificação das leucemias mieloides agudas – relação com a classificação FAB

<b>Leucemias mieloides agudas com anormalidades genéticas recorrentes</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ LMA com t(8;21)(q22;q22) – <b>RUNX1 – RUNX1T1</b></li><li>▪ LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;6)(p13.1;q22) – <b>CBFB – MYH11</b></li><li>▪ LMA/LPA (pró-mielocítica aguda) com t(15;17)(q22;q12) – <b>PML – RARα</b></li><li>▪ LMA com t(9;11)(p22;q23) – <b>MLLT3 – MLL</b></li><li>▪ LMA com t(6;9)(p23;q34) – <b>DEK – NUP214</b></li><li>▪ LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) – <b>RPN1 – EVI1</b></li><li>▪ LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13) – <b>RBM15 – MKL1</b></li></ul>
<b>Classificação ou entidade provisória</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ LMA com mutação <b>NPM1</b></li><li>▪ LMA com mutação <b>CEBPA</b></li></ul>
<b>Leucemias mieloides agudas com alterações relacionadas a mielodisplasias</b>
<b>Neoplasias mieloides agudas relacionadas a tratamento (t-LMA)</b>
<b>Leucemias mieloides agudas não especificadas separadamente (NOS, do inglês <i>not otherwise specified</i>)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ LMA com diferenciação mínima</li><li>▪ LMA sem diferenciação</li><li>▪ LMA com maturação</li><li>▪ Leucemia mielomonocítica aguda</li><li>▪ Leucemia monoblástica/monocítica aguda</li><li>▪ Leucemia eritroide aguda<ul style="list-style-type: none"><li>– Leucemia eritroide pura</li><li>– Eritroleucemia (eritroide/mieloide)</li></ul></li><li>▪ Leucemia megacarioblástica aguda</li><li>▪ Leucemia basofílica aguda</li><li>▪ Panmielose aguda com mielofibrose</li></ul>
<b>Sarcoma mieloide</b>
<b>Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Mielopoiese anormal transitória</li><li>▪ Leucemia mieloide associada à síndrome de Down</li></ul>

Fonte: Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

classificação franco-americana-britânica (classificação FAB), baseada principalmente nas características morfológicas das células blásticas leucêmicas, poderá ser, em curto ou em médio prazo, abandonada.

As principais alterações gênicas presentes nas LMAs são responsáveis pela produção de fatores de transcrição associados aos processos de proliferação e maturação das células mieloides. A descoberta da importância das mutações gênicas presentes na leucemogênese permitiu a identificação ou o diagnóstico de LMAs citogeneticamente normais.<sup>60-63</sup>



### Leucemias mieloides agudas com anormalidades genéticas recorrentes

Nesse grupo de LMAs, LMA t(8;21)(q22;q22) – *RUNX1-RUNX1T1*, LMA inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;6)(p13.1-q22) – *CBFB-MYH11* e LMA/LPA t(15;17)(q22;q12) – *PML-RAR $\alpha$* , o diagnóstico pode ser firmado apenas pela presença dessas mutações, independentemente de o número de blastos ser igual ou superior a 20% no sangue periférico e na medula óssea. No entanto, para as demais anormalidades desse grupo, a contagem de blastos igual ou superior a 20% se faz necessária.<sup>8</sup>

Uma controversa e importante dificuldade observada nesse grupo é quando há presença de proliferação blástica mieloide associada à mutação *BCR-ABL* (Ph1), pois os critérios de exclusão de LMC prévia em crise blástica não são convincentes. Por esse motivo, a mutação *BCR-ABL* não é reconhecida como causa primária de LMA.<sup>8</sup>

As mutações que comprometem os genes *NPM1* e *CEBPA* estão colocadas como entidades provisórias pelo fato de serem frequentemente acompanhadas por outras anormalidades gênicas, entre as quais e, particularmente, as que envolvem o gene *FLT3*.

### Leucemias mieloides agudas com alterações relacionadas a mielodisplasias

Esse grupo foi inicialmente colocado na classificação da OMS para que fosse possível a inclusão dos casos de LMAs caracterizados como SMD-like, os quais apresentam anormalidades citogenéticas com prognóstico desfavorável, multirresistência a medicamentos, baixa resposta terapêutica e displasias de células sanguíneas observadas em duas ou mais linhagens e em pelo menos 50% das células. Os critérios de inclusão para esse grupo de leucemias foram expandidos: (1) contagem de blastos igual ou superior a 20% no sangue periférico ou medula óssea; (2) histórico de SMD ou SMD/NMP prévia; (3) achados citogenéticos relacionados.<sup>8</sup>

De modo controverso, alguns estudos têm demonstrado a presença de displasias em duas ou mais células sanguíneas como importante fator prognóstico isolado,<sup>64,65</sup> enquanto outros estudos apontam a necessidade da associação desses achados com a observação de anormalidades citogenéticas.<sup>66,67</sup>

### Neoplasias mieloides agudas relacionadas a tratamento (t-LMA)

Esse grupo está associado ao desenvolvimento de LMA em pacientes com SMD, SMD/NMP tratados com agentes alquilantes e/ou radiação, assim

como inibidores da topoisomerase II, não havendo, no entanto, interesse na estratificação ou subdivisão desses grupos na prática. Podem ser denominados de t-LMA, t-SMD ou t-SMD/NMP, dependendo do número de blastos presentes. Tem sido demonstrado também que aproximadamente 90% dos pacientes submetidos a esses tipos de tratamento e que desenvolvem t-LMA possuem anormalidades citogenéticas idênticas àqueles que possuem LMA com anormalidades genéticas recorrentes, devendo, nesses casos, portanto, serem classificados no último grupo.

Exceto nos pacientes com t-LMA associada com inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22) ou t(15;17)(q22;q12), pacientes com neoplasias mieloides relacionadas a tratamento possuem resultado terapêutico significativamente pior quando comparados com LMAs com as mesmas anormalidades genéticas, sugerindo, dessa forma, características biológicas diferentes entre os tipos.<sup>68,70</sup> Embora muitos mecanismos patogênicos já estejam descritos, algumas questões ainda não estão claras, entre elas, por que apenas um pequeno grupo de pacientes que recebe esses tipos de tratamento desenvolve leucemia, e a grande maioria não? Nesse grupo da t-LMA, é recomendado que a anormalidade citogenética presente acompanhe a descrição diagnóstica.<sup>8</sup>

### Leucemias mieloides agudas não especificadas separadamente (NOS)

As leucemias mieloides agudas não especificadas separadamente (NOS, do inglês *not otherwise specified*) estão divididas em subgrupos, levando-se em consideração, principalmente, as características morfológicas. Possuem, por esse motivo, estreita relação com a classificação FAB, ou seja, incluem os principais tipos morfológicos dessa última: leucemia mieloide aguda com pouca diferenciação (M0) – leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima (OMS); leucemia mieloide aguda sem diferenciação ou indiferenciada (M1) – leucemia mieloide aguda sem diferenciação (OMS); leucemia mieloide aguda com diferenciação ou diferenciada (M2) – leucemia mieloide aguda com maturação (OMS); leucemia mielomonocítica aguda (M4) – leucemia mielomonocítica aguda (OMS); leucemia monoblástica (M5a)/monocítica (M5b) aguda – leucemia mieloblástica/monocítica aguda (OMS); eritroleucemia (M6) – leucemia eritroide aguda/leucemia eritroide pura/eritroleucemia (OMS); leucemia megacarioblástica



aguda (M7) – leucemia megacarioblástica aguda (OMS) (**Tabela 11.13**). Encontram-se descritas ainda na classificação da OMS, no grupo das leucemias mieloides agudas não especificadas separadamente, a leucemia basofílica aguda e a panmielose aguda com mielofibrose.

Compreendem atualmente apenas 25 a 30% de todos os casos de LMA e com contínuo decréscimo, à medida que novos subgrupos genéticos são descobertos.<sup>6</sup> As discussões que envolvem a manutenção da nomenclatura FAB juntamente com a classificação da OMS são intensas. Porém, no momento, há consenso entre os membros do Myeloid and Acute Leukemia Clinical Advisory Committee (CAC), comitê responsável pela revisão e nova classificação da OMS, de que apenas o subgrupo NOS seja utilizado, tendo como percepção que novas anormalidades genéticas poderão ainda ser descritas.

TABELA 11.13 Leucemias mieloides agudas não especificadas separadamente (NOS): relação do grupo OMS/NOS com a classificação FAB	
NOS (OMS-2008)	CLASSIFICAÇÃO FAB
LMA com diferenciação mínima	M0 – LMA com pouca diferenciação
LMA sem diferenciação	M1 – LMA sem diferenciação/ indiferenciada
LMA com maturação	M2 – LMA com diferenciação/ diferenciada
Leucemia mielomonocítica aguda	M4 – Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/ monocítica aguda	M5 – Leucemia monoblástica (M5a)/monocítica aguda (M5b)
Leucemia eritroide aguda <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Leucemia eritroide pura</li><li>▪ Eritroleucemia (eritroide/ mieloide)</li></ul>	M6 – Eritroleucemia
Leucemia megacarioblástica aguda	M7 – Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda	
Panmielose aguda com mielofibrose	

Fonte: Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

Sarcoma mieloide

Esse tipo de neoplasia, conhecido anteriormente como sarcoma granulocítico ou cloroma, caracteriza-se pela presença de proliferação blástica extramedular de uma ou mais linhagens mieloides,

modificando a arquitetura normal do tecido ou órgão envolvido. Embora qualquer tecido ou órgão possa ser afetado, compromete principalmente o trato gastrointestinal, os linfonodos e os ossos.<sup>6</sup> Com muita frequência, está associado com a presença prévia de LMA, sendo, nesses casos, considerado como tal, sua manifestação pode preceder as manifestações do sangue periférico e da medula óssea. Os achados morfológicos, citogenéticos e fenotípicos permitirão a alocação entre os subgrupos de LMA já conhecidos e descritos. Pode ser entendido também como falha no tratamento de pacientes com LMA e com suposta remissão, evidência de evolução para LMA em pacientes com diagnóstico prévio de SMD ou SMD/NMP e transformação ou crise blástica em portadores de NMP.<sup>8</sup>

Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down

Portadores da trissomia do cromossomo 21, também conhecida como síndrome de Down, possuem um elevado risco de desenvolvimento de leucemias ou de neoplasias hematológicas, sendo que os tipos mais comuns são a mielopoiese anormal transitória (SMD) e a leucemia mieloide aguda. Em ambos os casos, os achados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos moleculares são comuns, incluindo a mutação *GATA1*, os quais, por si só, justificam a classificação em um subgrupo próprio.<sup>71-73</sup>

LEUCEMIAS AGUDAS BIFENOTÍPICAS OU DE DUPLA LINHAGEM

Pelos critérios de revisão da quarta edição da OMS, esse grupo de neoplasias foi classificado em capítulo distinto das LMAs e LLAs e denominado de leucemia aguda de fenótipo misto (*MPAL*, do inglês *mixed phenotype acute leukemia*), sendo que a sua identificação está associada à presença de antígenos ou marcadores de linhagem mieloide e linfoide na mesma célula blástica ou à coexistência de populações de blastos mieloides e linfoides.<sup>23-28</sup> Embora não seja via de regra, alguns marcadores como CD34, HLA-DR, CD38 e TdT geralmente estão expressos. A positividade para mieloperoxidase pode ser necessária em alguns casos para distinguir de leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima, lembrando que nessa última antígenos da linhagem linfoide não estarão expressos (**Quadro 11.17**).<sup>8</sup>



QUADRO 11.17 Critérios de classificação das leucemias agudas de fenótipo misto
<b>Linhagem mieloide</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Mieloperoxidase positiva (citometria de fluxo, IHQ, ICQ)</li><li>▪ Diferenciação monocitoide (pelo menos dois dos critérios: ENE, CD11c, CD14, CD64, lisozima)</li></ul>
<b>Linhagem linfoide T</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ CD3c+ (citometria de fluxo com Ac CD3 cadeias épsilon; IHQ com Ac policlonal para detecção de CD3 cadeias zeta não célula-T específica)</li><li>▪ CD3+ membrana (raro na MPAL)</li></ul>
<b>Linhagem linfoide B</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ CD19 fortemente expresso com pelo menos um: CD79a, CD22c, CD10</li><li>▪ CD19 fracamente expresso com pelo menos dois: CD79a, CD22c, CD10</li></ul>

IHQ, imuno-histoquímica; ICQ, imunocitoquímica; ENE, esterase não específica; Ac, anticorpo.  
**Fonte:** Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

NEOPLASIAS LINFÓIDES

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)

A LLA tem como causa o acúmulo de mutações somáticas em células precursoras da linhagem linfóide B ou T (linfoblastos), levando a um descontrole da proliferação celular, interrupção na diferenciação e resistência à indução apoptótica.<sup>10,40</sup> Em 80% dos casos, estão envolvidos linfócitos de linhagem B, sendo que a causa citogenética mais comum é a translocação entre os cromossomos 12 e 21, t(12;21) (p13;q22) (*TEL-AML1*), presente aproximadamente em 25% dos casos em crianças. Essa mutação pode estar presente em cerca de 10% de recém-nascidos, necessitando, no entanto, de um segundo evento para a instalação da doença, desencadeado, provavelmente, por infecções na infância. A translocação t(9;22) também é comum nesse grupo de leucemia, com um pior prognóstico, levando-se em conta a maior dificuldade de manutenção de remissão e provocando, em um elevado número de casos, a necessidade de um transplante de medula óssea. A diferença prognóstica da doença entre lactentes, crianças e adultos é explicada pela diferença de causas citogenéticas entre esses grupos. Pode infiltrar o tecido linfóide periférico, o sistema nervoso central, bem como os testículos.

Representa 12% de todos os casos de leucemias diagnosticadas nos Estados Unidos, sendo que 60% ocorrem em idades inferiores a 20 anos,

caracterizando-se como a doença neoplásica mais comum abaixo dos 15 anos de idade.<sup>5</sup> Nessa faixa etária, corresponde a aproximadamente um terço de todos os tipos de câncer e a 80% de todas as leucemias.<sup>5</sup> Em adultos, é responsável por 20% de todos os casos de leucemias agudas, com maior incidência entre 30 e 40 anos.<sup>5</sup>

Os achados laboratoriais no hemograma, ao diagnóstico, geralmente são anemia, neutropenia e trombocitopenia. A intensidade dessas citopenias, como nas LMAs, é diretamente proporcional ao grau de comprometimento da medula óssea pelas células blásticas leucêmicas e, na maioria dos casos, também ao número de blastos circulantes. A leucometria é variável, podendo ser baixa, normal ou alta, ou seja, desde uma leucopenia (1.000 leucócitos/ $\mu$ L) até uma leucocitose extrema, acima de 150.000 leucócitos/ $\mu$ L.<sup>5</sup>

A medula óssea é hiper celular, com contagem de blastos superior a 20% entre as células nucleadas.

A classificação FAB, considerando os aspectos morfológicos, determina três grupos para as LLAs: leucemia linfoblástica aguda do tipo L1 (LLA-L1), leucemia linfoblástica aguda do tipo L2 (LLA-L2) e leucemia linfoblástica aguda do tipo L3 (LLA-L3).

**Leucemia linfoblástica aguda do tipo L1 (LLA-L1)**

Caracteriza-se morfolologicamente por blastos de pequeno tamanho (variando entre 1 a 2 vezes o tamanho de um linfócito pequeno), citoplasma escasso e com basofilia discreta ou moderada. O núcleo é arredondado, ocupando praticamente todo o citoplasma (elevada relação N/C), podendo apresentar endentações, porém, com nucléolo geralmente não visível<sup>74</sup> (**Figura 11.33**).

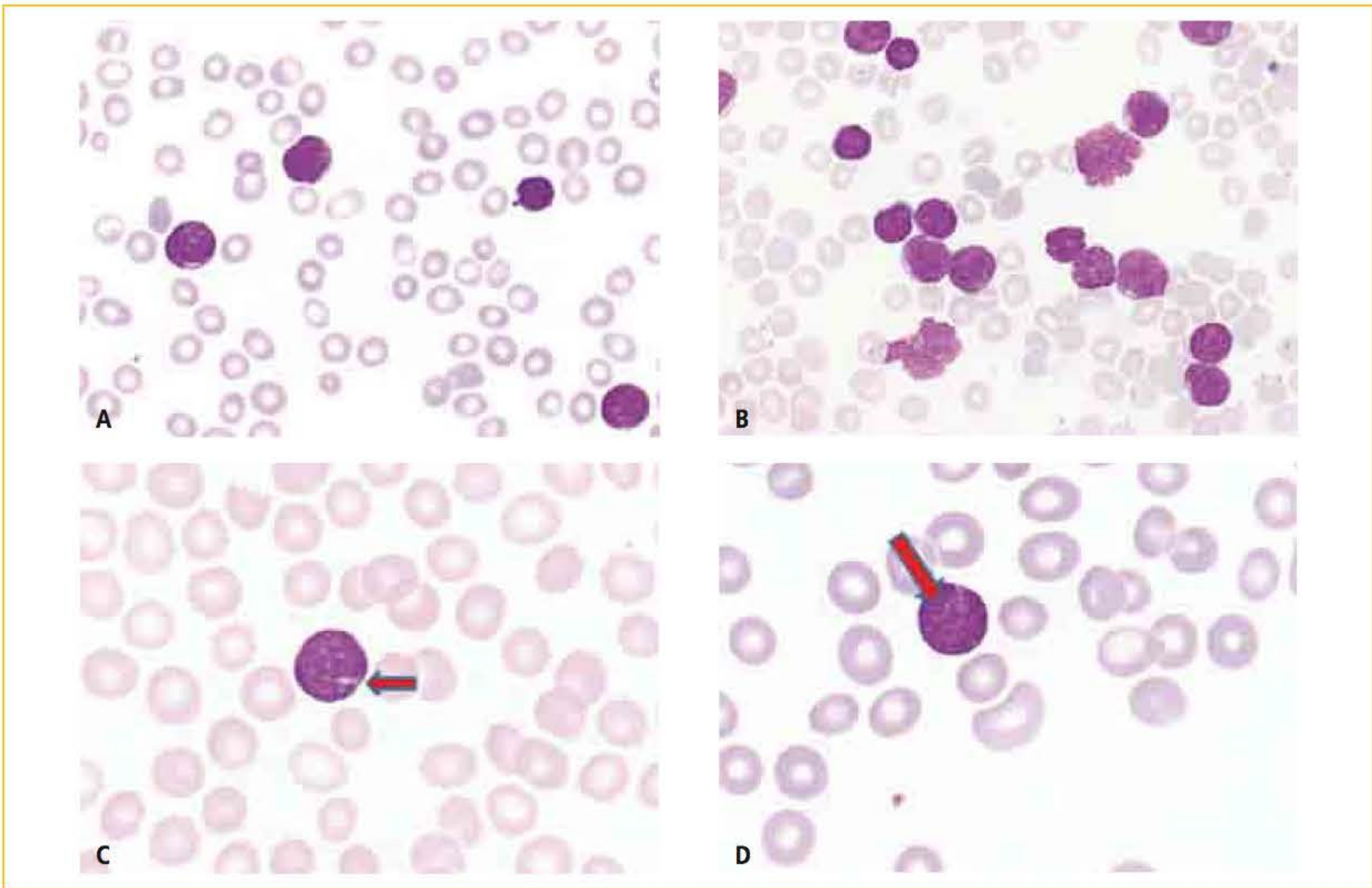
**Leucemia linfoblástica aguda do tipo L2 (LLA-L2)**

Os blastos do tipo L2 se apresentam com maior tamanho, citoplasma mais abundante e com basofilia discreta a moderada. O núcleo possui forma irregular, podendo ser clivado, com nucléolo aparente, geralmente único ou em número de dois (**Figura 11.34**).

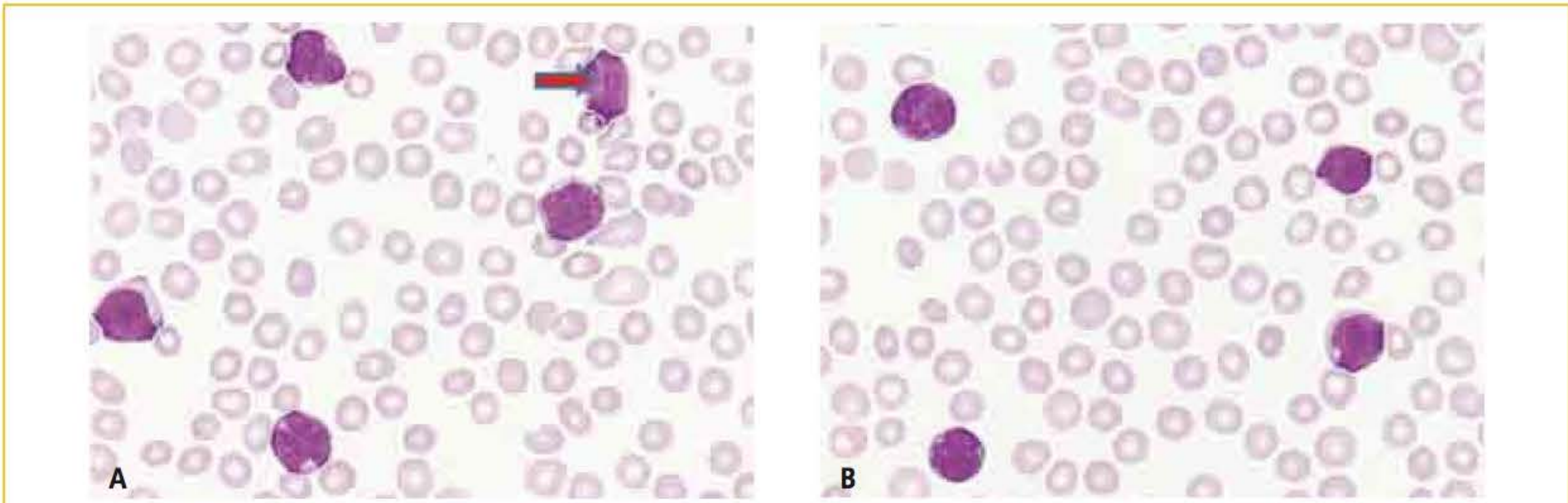
**Leucemia linfoblástica aguda do tipo L3 (LLA-L3)**

A morfologia L3 é caracterizada por células grandes, com citoplasma de moderado a abundante, porém, marcado com intensa basofilia e vacuolização. O núcleo ocupa grande parte do citoplasma (elevada relação N/C) com nucléolo proeminente (**Figura 11.35**).

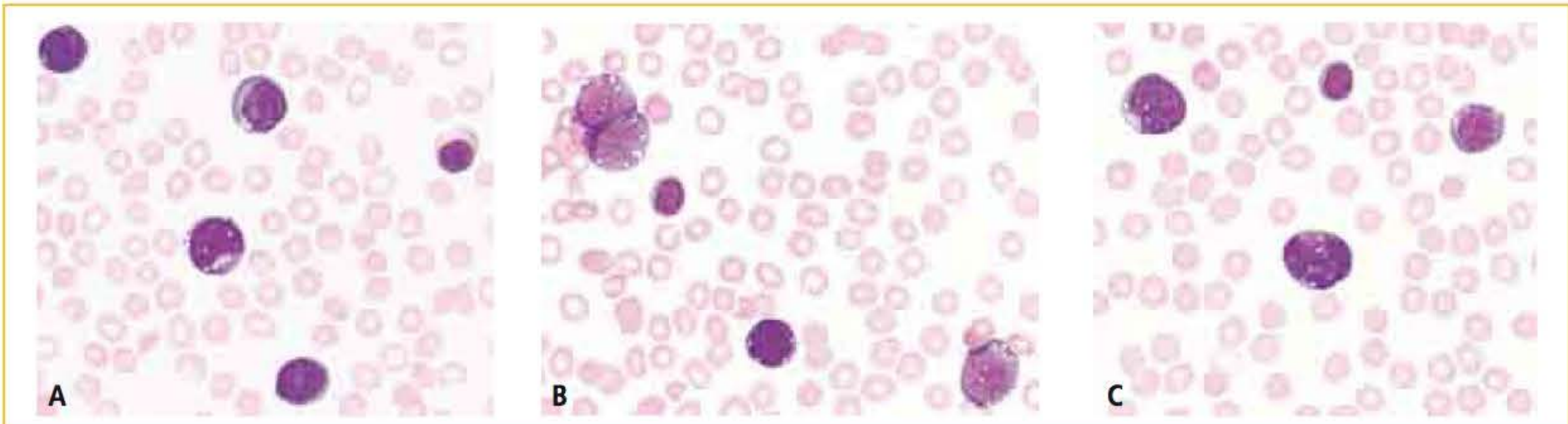




**FIGURA 11.33** Linfoblastos linfoides L1. (A, B, C, D) Blastos pequenos, citoplasma escasso com elevada relação N/C. (B) Presença de restos nucleares. (C, D) Presença de endentação (seta).



**FIGURA 11.34** Linfoblastos L2. (A,B) Notar o maior tamanho dos blastos e o aspecto irregular do núcleo. (A) núcleo clivado (seta).



**FIGURA 11.35** Linfoblastos L3. Notar em (A, B, C) a intensa basofilia e vacuolização citoplasmática.



Embora ainda os aspectos morfológicos determinem a primeira constatação desse grupo de neoplasias pela presença de blastos (linfoblastos) no sangue periférico e na medula óssea, após o aparecimento e a utilização da citogenética e da imunofenotipagem, a classificação morfológica (FAB) vem sendo abandonada. As classificações da OMS, tanto a primeira como a revisão de 2008,<sup>8</sup> contribuíram de forma direta para que isso ocorresse, pois foram fundamentadas essencialmente nos achados citogenéticos e imunofenotípicos. Essa mudança permitiu um maior entendimento e compreensão do comportamento clínico, tratamento e prognóstico que caracterizam os diferentes subgrupos das neoplasias linfoides. A classificação OMS, revisão de 2008<sup>8</sup> para as neoplasias linfoides, determina uma estratificação em dois grandes grupos: leucemia linfoblástica/linfomas de células-B e leucemia linfoblástica/linfomas de células-T, sendo que o primeiro grupo é ainda subdividido em subgrupos, como mostra o **Quadro 11.18**.

**QUADRO 11.18** Critérios de classificação das neoplasias do tecido linfoide

- 1) Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B NOS
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com anormalidades genéticas recorrentes
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com t(9;22)(q34;q11.2) – *BCR-ABL 1*
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com t(v;11q23) – rearranjo *MLL*
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML 1 (ETV6-RUNX1)*
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com hiperploidia
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com hipoploidia
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com t(5;14)(q31;q32) *IL3-IGH*
  - Leucemia linfoblástica/linfoma de células-B com t(1;19)(q23;p13.3) – *TCF3-PBX1*
2) Leucemia linfoblástica/linfoma de células-T

Fonte: Vardman e colaboradores.<sup>8</sup>

A revisão OMS-2008<sup>8</sup> manteve a convenção utilizada por muitos protocolos de tratamento, sugerindo a preferência da denominação de leucemia linfoblástica e não linfoma linfoblástico, quando há uma contagem superior a 25% de blastos, entre as células nucleadas da medula óssea, pelo fato de a LLA raramente apresentar uma baixa contagem dessas células (menor que 20%) na medula óssea. Nos raros casos em que a quantidade de blastos na medula óssea for inferior a 20% entre

as células nucleadas com ausência de doença extramedular, mas demonstrando alterações citogenéticas conhecidas recorrentes ou associadas com LLA, o diagnóstico de LLA pode ser considerado. Entretanto, quando a contagem de linfoblastos na medula óssea for, de forma inequívoca, inferior a 20%, também deve ser investigada a possibilidade de doença extramedular para a exclusão de linfoma linfoblástico.

Os achados citogenéticos podem ser identifi- cados facilmente, na maioria das vezes, por técni- cas de FISH e RT-PCR, com sensibilidade suficien- te para detectar anormalidades submicroscópicas. Tais anormalidades possuem, sabidamente, rela- ção direta com o comportamento e prognóstico da doença, por exemplo, na diferenciação entre casos de t(12;21)(p13;q22) e t(9;22)(q34;q22) *BCR-ABL 1* primária, em que a última, como já comentado an- teriormente, tem menor resposta à quimioterapia, determinando, portanto, maior dificuldade de re- missão e, conseqüentemente, maior possibilidade de recidiva, abrindo para esses pacientes a neces- sidade de um provável transplante de medula óssea.

As leucemias linfoblásticas/linfomas de célu- las-T também apresentam anormalidades citoge- néticas recorrentes em 50 a 70% dos casos, sendo mais comuns as translocações envolvendo os *loci* (14q11.2) dos receptores  $\alpha$  e  $\delta$  (delta) das células T, *locus* do receptor  $\beta$  (7q35) ou *locus* do receptor  $\gamma$  (gama) (7p14-15), os quais envolvem uma lista crescente de genes parceiros.

A correlação entre a imunofenotipagem e a ci- togenética nas neoplasias do tecido linfoide, ou seja, o reconhecimento da anormalidade citoge- nética das células tumorais pelo imunofenótipo tem ganhado relevância, pois tem demonstrado ótima sensibilidade e especificidade, além de per- mitir maior rapidez no processo de identificação de causa, levando-se em conta maior facilidade técnica na execução da imunofenotipagem, prin- cipalmente por citometria de fluxo.

■ **LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA (LLC)**

Entre as leucemias que incidem em adultos, a leu- cemias linfocítica crônica (LLC) é a mais prevalen- te no Ocidente, tendo, porém, baixa incidência em países do extremo Oriente. Não foi observada as- sociação da doença com fatores ambientais, tais como radiações ionizantes e agentes carcinogêni- cos químicos (agrotóxicos, quimioterápicos anti- neoplásicos e exposição funcional, entre outros).



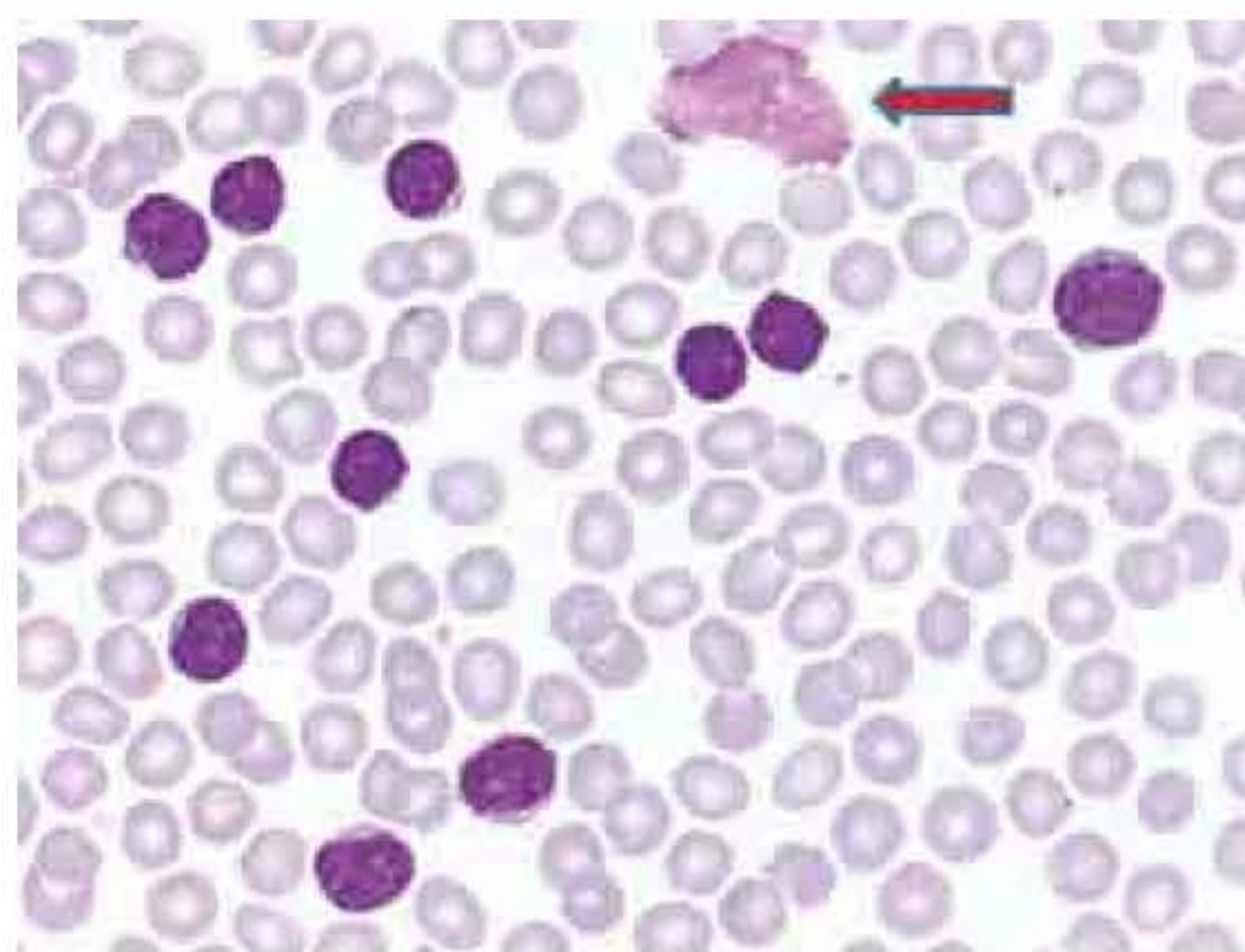
Pode ter característica familiar ou esporádica (mutações somáticas), sendo a segunda a mais comum entre elas.<sup>5,11</sup> Comprometem especificamente pessoas adultas, na grande maioria dos casos, acima da quinta ou sexta décadas de vida, tendo um significativo aumento no pico de incidência com a progressão da idade após os 60 anos. Entretanto, incide raramente em pessoas com idade inferior aos 50 anos.<sup>12</sup>

A apresentação clínica dessa neoplasia é bastante heterogênea entre os indivíduos acometidos; possui sobrevida variável de alguns meses a décadas. Ao diagnóstico, aproximadamente dois terços dos pacientes apresentam-se assintomáticos, tendo como motivo de diagnóstico inicial o resultado do hemograma realizado ao acaso. Entre os principais sinais e sintomas clínicos da doença estão linfadenopatias cervicais e inguinais bilaterais, hipertrofia das tonsilas, sinais de anemia, febre (pela imunossupressão – hipogamaglobulinemia, disfunção da imunidade celular e humoral e neutropenia), esplenomegalia (mais comum), hepatomegalia (menos comum) e, mais raramente, manifestações associadas à trombocitopenia.<sup>40</sup>

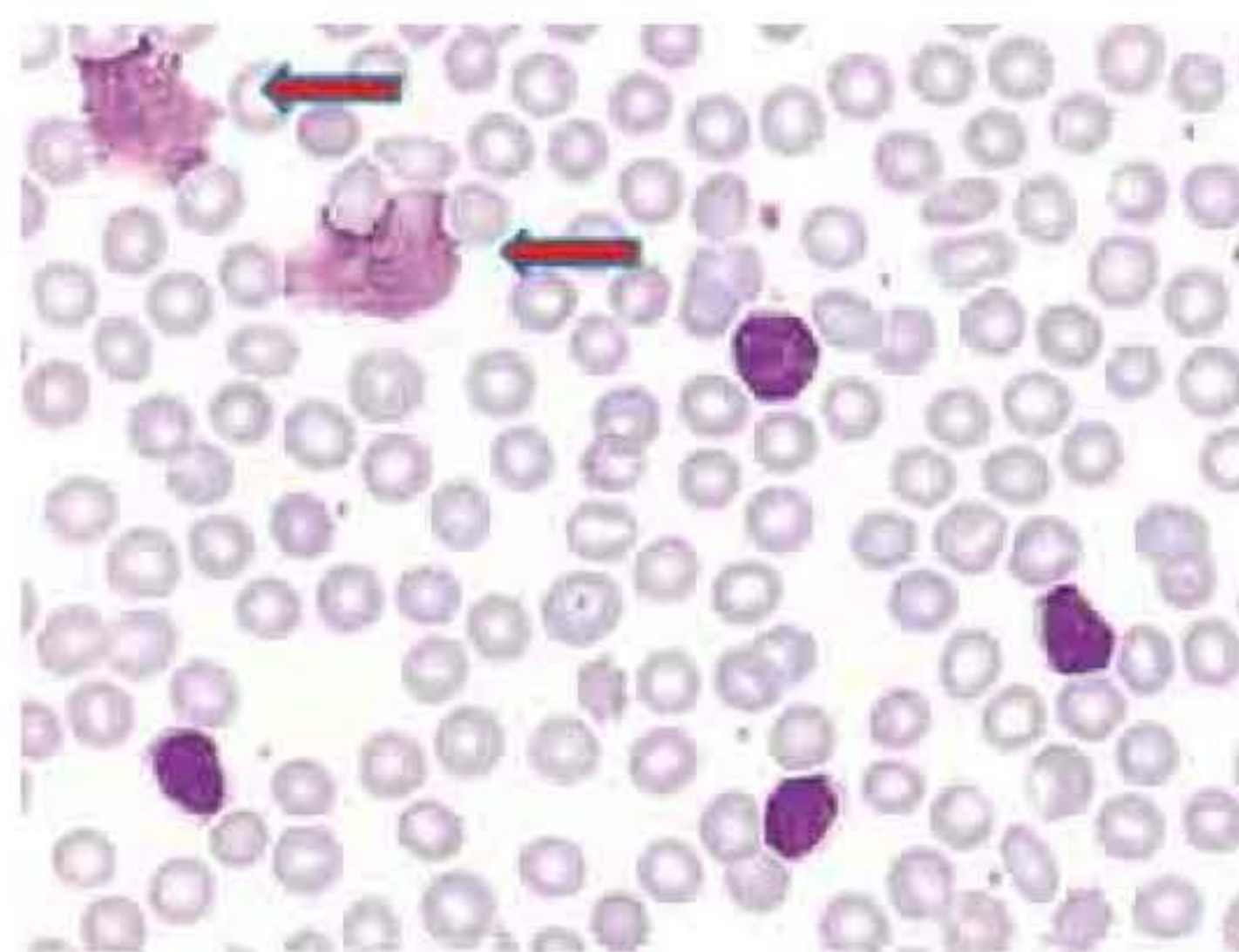
Aproximadamente a metade dos portadores de LLC não desenvolverá quaisquer eventos secundários à doença hematológica. Por outro lado, a outra metade evoluirá com progressão da doença, necessitando de ação terapêutica e tendo como causa de óbito complicações relacionadas a ela.<sup>75</sup>

Laboratorialmente, caracteriza-se por linfocitose crônica relativa (acima de 70% de linfócitos maduros) e absoluta (acima de 5.000 linfócitos/ $\mu$ L) persistente no sangue periférico, predominando no esfregaço a morfologia de linfócitos maduros e pequenos. No entanto, na grande maioria dos casos, pode haver variação de morfologia, sendo, às vezes, pró-linfócitos (células maiores, com citoplasma mais abundante, núcleo com condensação cromatínica visível, porém com nucléolo bem aparente) ou linfócitos atípicos (com citoplasma mais abundante e cromatina mais frouxa ou ainda do tipo plasmocitoide).

A presença de restos nucleares (sombas ou manchas de Gümprrecht) é um achado bastante comum, resultante da fragilidade dessas células, as quais se arrebentam no momento da confecção da distensão sanguínea em lâmina (efeito que acontece apenas *in vitro* e não *in vivo*), aumentando sua quantidade na proporção em que o número de linfócitos também se eleva (Figuras 11.36 a 11.39).



**FIGURA 11.36** Linfocitose em sangue periférico. Linfócitos pequenos e maduros. Presença de restos nucleares (sombas de Gümprrecht – seta vermelha) (coloração MGG).

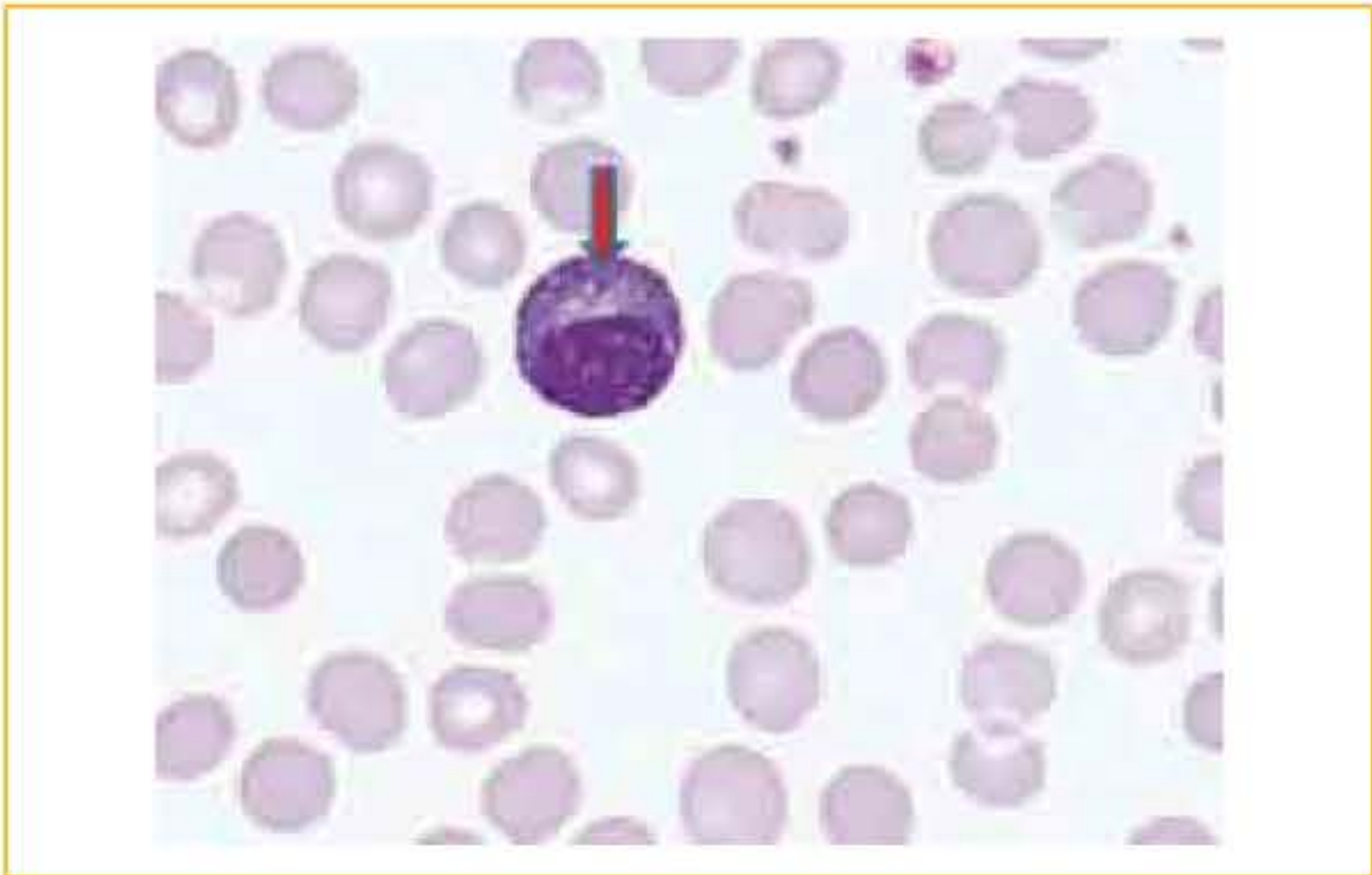


**FIGURA 11.37** Linfocitose em sangue periférico. Linfócitos pequenos e maduros. Presença de restos nucleares (sombas de Gümprrecht – seta vermelha) (coloração MGG).



**FIGURA 11.38** Pró-linfócitos. Notar aspectos de condensação cromatínica e presença de nucléolos evidentes (setas) (coloração MGG).





**FIGURA 11.39** Linfócitos atípicos do tipo plasmocitoide (plasmócios). Observar características morfológicas: citoplasma abundante e fortemente basófilo, núcleo periférico com cromatina condensada, área clara perinuclear (seta) (coloração MGG).

A leucometria, normalmente, encontra-se entre 25.000 e 100.000 leucócitos/ $\mu$ L, podendo, no entanto, chegar a valores superiores a 300.000 leucócitos/ $\mu$ L. A trombocitopenia é o achado mais comum, porém, contagens normais de plaquetas e, mais raramente, trombocitose também podem ser encontradas. Anemia normocítica e normocrômica pode estar presente, no entanto, com comprovado grau de variabilidade. No exame da medula óssea, deve estar evidente uma hiperplasia da linhagem linfóide, com o percentual de linfócitos acima de 30% entre as células nucleadas. O National Cancer Institute, em 1996, e o International CLL Workshop, em 1999, recomendam os critérios morfológicos necessários para o diagnóstico da LLC (**Quadro 11.19**).<sup>76</sup>

QUADRO 11.19 Critérios diagnósticos de leucemia linfocítica crônica segundo o National Cancer Institute e o International CLL Workshop	
NATIONAL CANCER INSTITUTE, EM 1996	INTERNATIONAL CLL WORKSHOP, EM 1999
1. Sangue periférico com contagem de linfócitos > 5.000/ $\mu$ L 2. Marcadores de células B (CD19+, CD20+, CD23+) e ser CD5+ 3. Mielograma com mais de 30% de linfócitos maduros	1. Sangue periférico com mais de 10.000 linfócitos/ $\mu$ L 2. Mielograma com mais de 30% de linfócitos maduros 3. Linfócitos CD5+
INTERPRETAÇÃO	
Todos os critérios devem estar presentes	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Critérios 1 e 2 presentes</li><li>▪ Critério 3 presente</li><li>▪ Contagem de linfócitos &lt; 10.000/<math>\mu</math>L – os critérios 2 e 3 devem estar presentes</li></ul>

Fonte: Hallek e colaboradores.<sup>76</sup>

Pode ocorrer na LLC o desenvolvimento de autoanticorpos, principalmente contra eritrócitos (na maioria dos casos, são imunoglobulinas anti-D), desencadeando nesses pacientes uma anemia hemolítica com teste de Coombs positivo. Anticorpos contra neutrófilos e plaquetas são também bastante comuns, podendo agravar a neutropenia e a trombocitopenia que geralmente já se fazem presentes.<sup>11</sup>

Observando-se ainda os aspectos morfológicos dos linfócitos, a LLC pode ser classificada em LLC comum ou típica, LLC mista, LLC com transformação pró-linfocítica e LLC pró-linfocítica (**Quadro 11.20**).

QUADRO 11.20 Principais características morfológicas nos diferentes tipos de leucemia linfocítica crônica (aspectos morfológicos)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ LLC comum – Predomínio de linfócitos maduros pequenos</li><li>▪ LLC mista – Proporção variável de linfócitos atípicos</li><li>▪ &lt; 10% de pró-linfócitos</li><li>▪ LLC com transformação pró-linfocítica – Pró-linfócitos &gt; 10% e &lt; que 55%</li><li>▪ LLC pró-linfocítica – Pró-linfócitos &gt; 55%</li></ul>

Fonte: Hallek e colaboradores.<sup>76</sup>

**Leucemia linfocítica comum ou clássica**  
Há algumas décadas, com base nos achados do hemograma e nos aspectos clínicos e de sobrevida dos portadores de LLC, primeiramente Rai, em 1975,<sup>77</sup> e posteriormente Binet, em 1981,<sup>78</sup> estabeleceram uma estratificação prognóstica para esses pacientes, embora se saibam, atualmente, limitações que ambas apresentam<sup>77,78</sup> (**Tabelas 11.14 e 11.15**).

**Aspectos genéticos e moleculares da LLC**  
Com relação à linhagem celular, é uma neoplasia prevalentemente de linfócitos B, embora linfócitos T possam, eventualmente, também estar envolvidos. Entre as alterações citogenéticas mais conhecidas, está a deleção 13q (-13q14), que é a mais encontrada e de prognóstico mais favorável. A presença de cariótipo normal ou trissomia 12q (12+) determina risco intermediário e a deleção 11q (-11q23) e a deleção 17p (17p-) as neoplasias de evolução desfavorável, sendo essa última, entre todas, a de pior prognóstico, pois seus portadores possuem notadamente má resposta aos tratamentos convencionais e curva de sobrevida média menor. A provável explicação para isso é que, no



TABELA 11.14 Estadiamento de Rai para leucemia linfocítica crônica			
ESTÁGIO	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	SOBREVIDA (MESES)	RISCO
0	Linfocitose apenas no sangue periférico e na medula óssea	> 120	Baixo
I	Linfocitose + linfadenopatia	95	Intermediário
II	Linfocitose + hepatoesplenomegalia	72	Intermediário
III	Linfocitose + anemia (hemoglobina < 11 g/dL)	30	Alto
IV	Linfocitose + trombocitopenia (plaquetas < 100.000/μL)	30	Alto

Fonte: Rai e colaboradores.<sup>77</sup>

TABELA 11.15 Estadiamento de Binet para leucemia linfocítica crônica		
ESTÁGIO	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	SOBREVIDA (ANOS)
A	< 3 áreas de envolvimento linfoide Ausência de anemia e de trombocitopenia	> 10
B	> 3 áreas de envolvimento linfoide Ausência de anemia e de trombocitopenia	7
C	Hemoglobina < 10 g/dL Plaquetas < 100.000/μL	7

Fonte: Binet e colaboradores.<sup>78</sup>

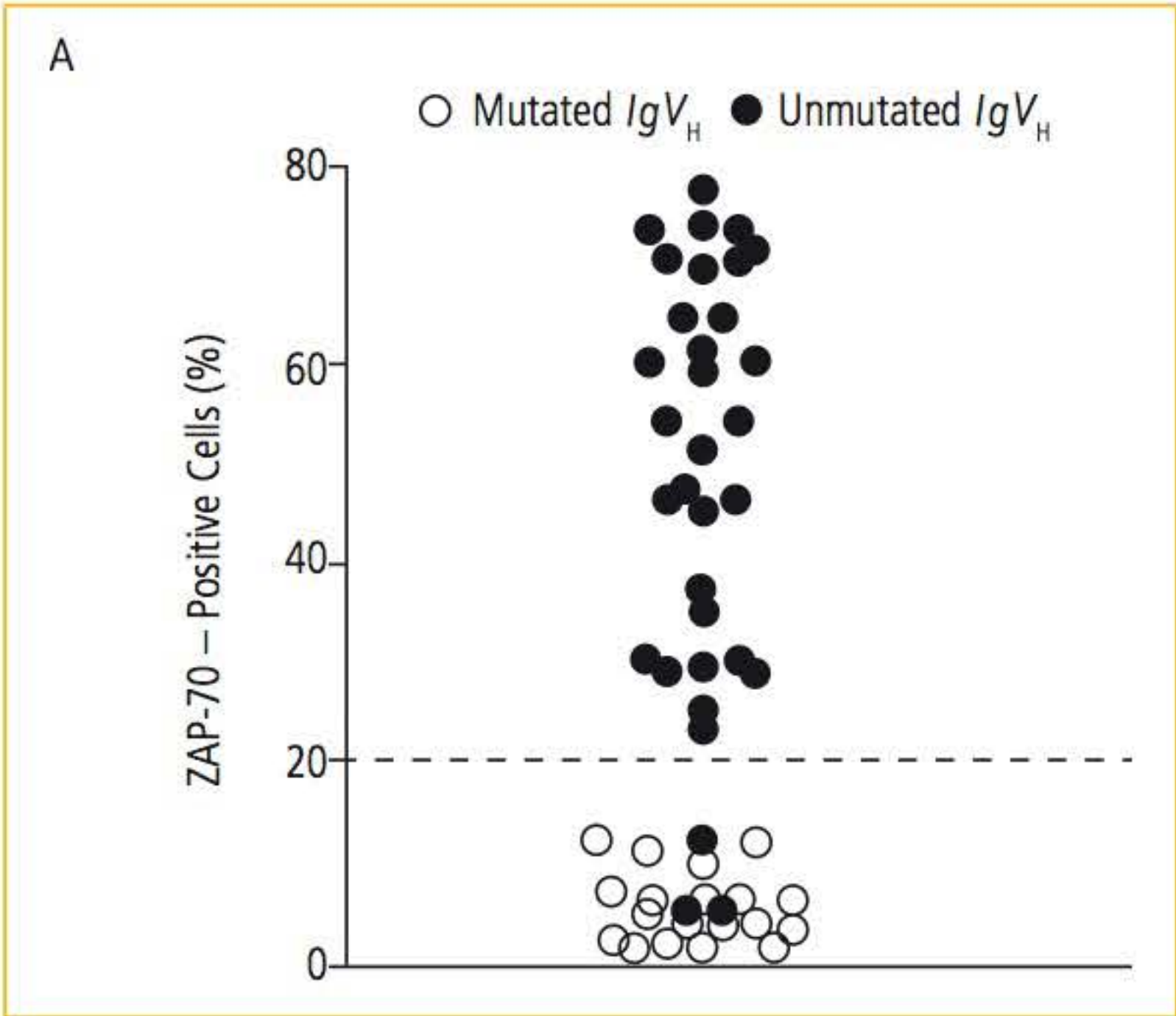
braço curto do cromossomo 17, encontra-se o gene da *p53*, principal proteína supressora de tumor e indutora de apoptose celular.<sup>40,75,79</sup>

Embora o cariótipo convencional possa ser utilizado para a identificação das alterações citogenéticas, a técnica FISH é a mais recomendada pelo fato de que, mesmo nos casos de baixa proliferação celular, possibilita a identificação de alterações cromossômicas por utilizar células em interfase.<sup>75</sup>

Outro fator prognóstico ou de risco relevante atualmente conhecido é a presença do estado de hipermutação dos genes que secretam a porção variável da cadeia pesada das imunoglobulinas (*IgVH*) em linfócitos B. Mutações aleatórias nessas células nos centros germinativos dos órgãos linfoides secundários são uma característica fisiológica importante e comum, partindo-se do princípio de que a principal função do linfócito B é o reconhecimento de antígenos. No entanto, mutações somáticas aleatórias podem determinar o estado de hipermutação em aproximadamente metade dos pacientes com LLC, sendo que esse achado confere uma predição de melhor prognóstico para esses pacientes, quando comparados à ausência da hipermutação *IgVH*. Por esse motivo, em primeira instância, os pacientes com LLC

passaram a ser classificados como portadores ou não do estado de hipermutação *IgVH*, sendo esse considerado padrão-ouro para a avaliação prognóstica.<sup>40,75</sup> No entanto, por ser a metodologia empregada para esse fim muito trabalhosa e de difícil aplicação na prática laboratorial rotineira, caracterizando, dessa forma, um obstáculo, ocorreu o surgimento de novos marcadores prognósticos utilizando-se métodos laboratoriais de mais fácil execução e aplicação (imunofenotipagem por citometria de fluxo) e que puderam ser correlacionados de forma confiável com a hipermutação *IgVH*, substituindo, assim, a investigação direta dessa condição. Entre os novos marcadores, a expressão da proteína ZAP-70, pertencente à família das tirosinoquinases essenciais na sinalização dos linfócitos T, porém ausente no linfócito B normal, aparece como a mais importante na evidência da ausência de hipermutação *IgVH*. O entendimento dessa correlação é de que alta expressão de ZAP-70 é encontrada em pacientes sem a hipermutação *IgVH*, e a baixa expressão está relacionada com a hipermutação e, portanto, com um prognóstico melhor (**Figura 11.40**). Marcadores como CD-38 e *LPL* também obedecem a esse mesmo raciocínio, embora esse último necessite de estudos confirmatórios complementares.<sup>80-81</sup>





**FIGURA 11.40** Relação entre a expressão de ZAP-70 e a presença da hipermutação do gene *IgVH* nas LLCs.

Fonte: Crespo e colaboradores.<sup>81</sup>

Ainda dentro da avaliação geral prognóstica da LLC, outros elementos, tais como tempo de duplicação linfocitária, padrão de infiltração da medula óssea pelo tecido linfoide, desidrogenase láctica (LDH),  $\beta$ -2-microglobulina, timidinaquinase e CD23 solúvel, quando disponíveis, podem ser somados para determinação das evidências prognósticas da LLC<sup>75</sup> (**Tabela 11.16**).

**Leucemia pró-linfocítica crônica (LPC)**

Além da diferente apresentação com relação à morfologia celular (contagem de pró-linfócitos

superior a 55%) (**Figura 11.38**), nesse tipo de leucemia, a leucometria é geralmente mais elevada e a proliferação linfocitária é mais rápida, sinal de pior prognóstico. A esplenomegalia é um achado frequente, porém sem linfadenopatia. A imunofenotipagem é positiva para imunoglobulinas de superfície e negativa ou fracamente positiva para CD5.<sup>5</sup>

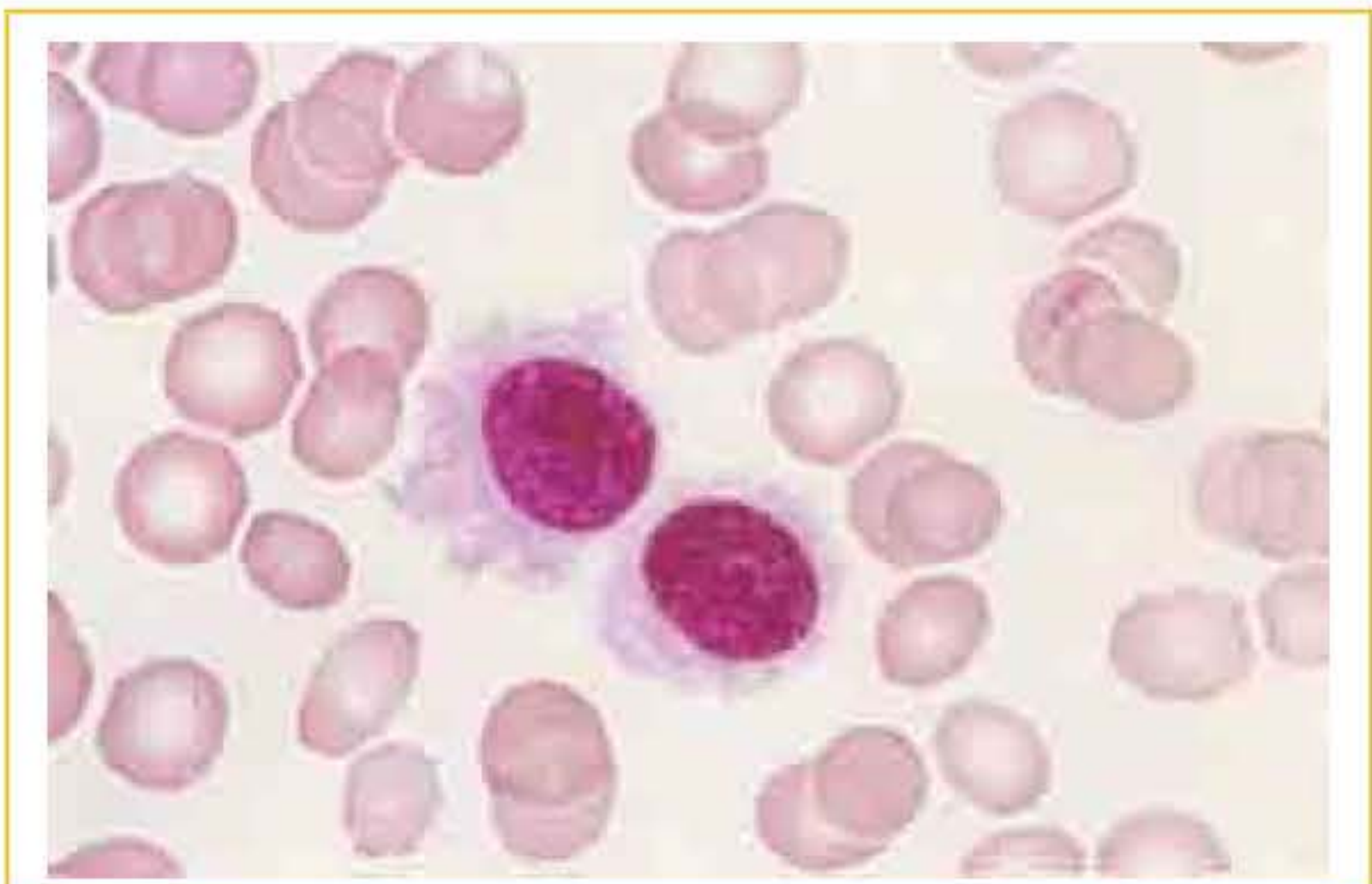
**Leucemias de células pilosas (LCP)**

A LCP, também conhecida por leucemia de células cabeludas (*hairy cell*) ou tricoleucemia, é uma variante neoplásica de linfócitos B, com incidência entre 40 e 60 anos, com franca prevalência em homens (4:1). A apresentação clínica é normalmente composta por anemia, esplenomegalia (raramente linfadenopatia) e infecções, sendo essas devido à neutropenia. O achado laboratorial mais frequente é pancitopenia, com contagem de leucócitos raramente superior a 20.000/ $\mu$ L. A morfologia dos linfócitos é muito característica, pois são normalmente linfócitos grandes e com evidentes projeções ou franjas citoplasmáticas (**Figuras 11.41 e 11.42**). O exame da medula óssea denota, em geral, uma infiltração difusa com aspectos de fibrose que pode ser de leve a moderada. A imunofenotipagem é característica, com positividade para CD22, FMC7 e CD103, na maioria dos casos.<sup>40</sup>

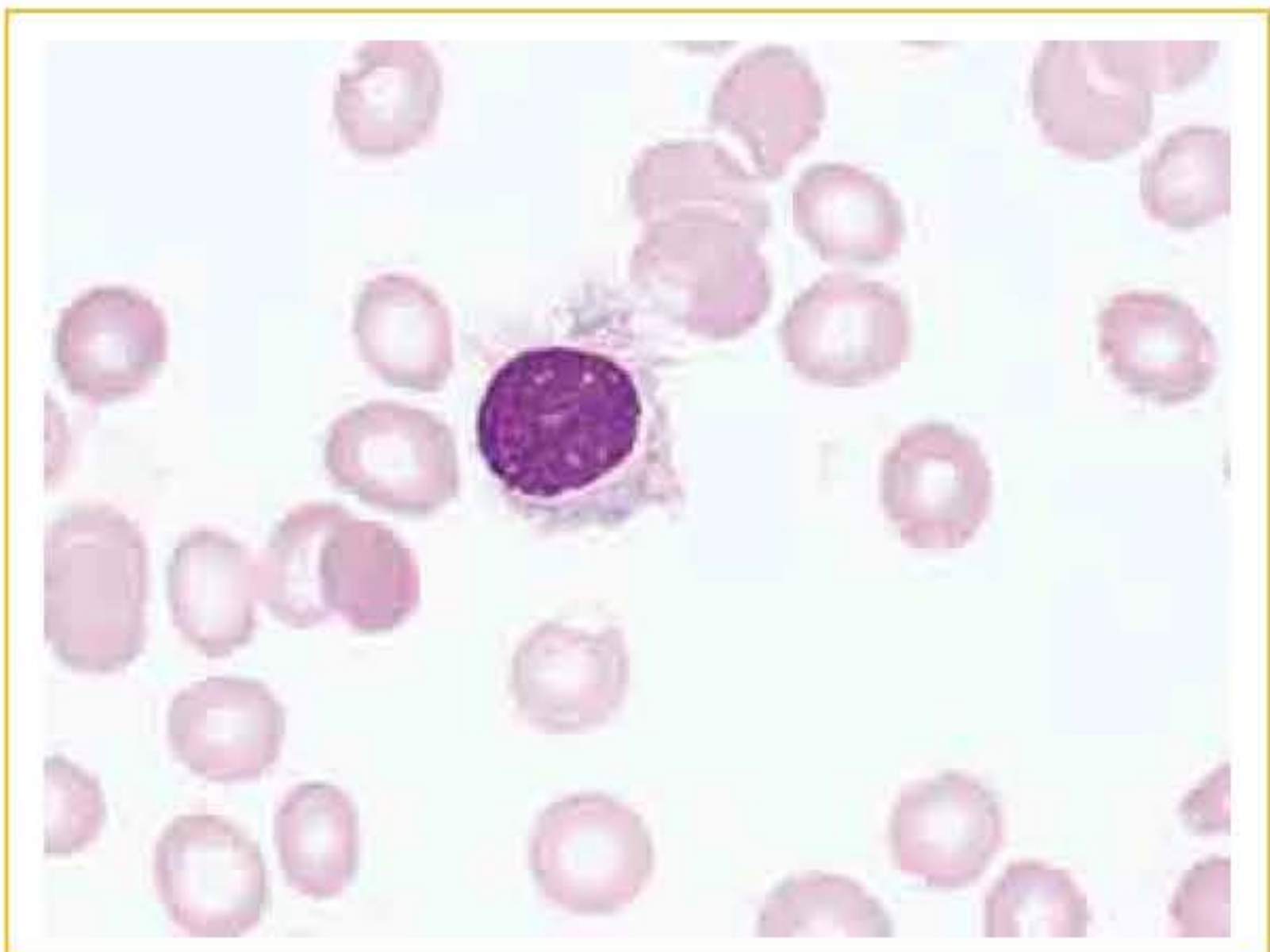
A **Tabela 11.17** evidencia alguns aspectos imunofenotípicos dos principais tipos de neoplasias linfoproliferativas crônicas de medula óssea.

TABELA 11.16 Fatores prognósticos diversos utilizados na leucemia linfocítica crônica e sua interpretação			
FATOR	BOM	INTERMEDIÁRIO	MAU
Estadiamento de Rai	0 – I	II	III – IV
Estadiamento de Binet	A	-	B – C
Alteração citogenética	(-13q14)	Trissomia 12 Citogenética normal	(-17p) (-11q23)
Hipermutação IgVH	Presente	-	Ausente
Expressão de ZAP-70	Baixa	-	Alta
Expressão de CD-38	Baixa	-	Alta
Infiltração da medula óssea	Nodular	-	Difusa
LDH	Normal	-	Elevada
B-2-microglobulina	Normal	-	Elevada
Tempo de duplicação linfocitária	$\leq$ 12 meses	-	> 12 meses
CD 23 solúvel	-	-	Elevado
Timidinaquinase	-	-	Elevada





**FIGURA 11.41** Células cabeludas (linfócitos grandes exibindo evidentes projeções ou franjas citoplasmáticas) (coloração MGG).



**FIGURA 11.42** Células cabeludas (linfócitos grandes exibindo evidentes projeções ou franjas citoplasmáticas) (coloração MGG).

TABELA 11.17 Imunofenótipo das leucemias linfocíticas crônicas			
	LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA COMUM (LLC)	LEUCEMIA PRÓ-LINFOCÍTICA CRÔNICA (LPC)	LEUCEMIA DE CÉLULAS PILOSAS (LCP)
IgS	Fraca	++	-
CD5	+	-	-
CD22/FMC7	-	+	+
CD23	+	-	-
CD79b	-	++	-/+
CD103	-	-	+

IgS, imunoglobulinas de superfície.

:: LINFOMAS

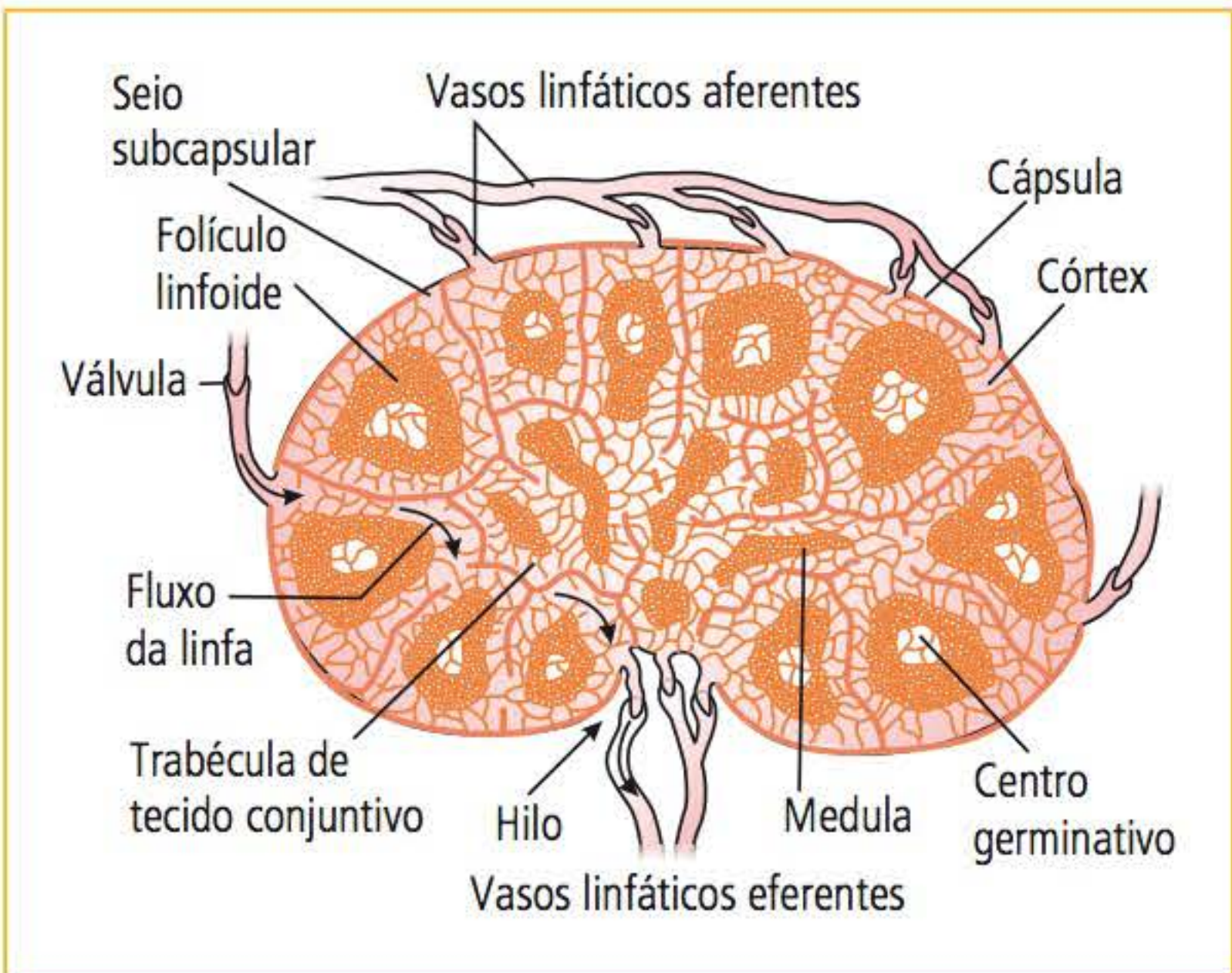
Os linfomas são caracterizados por um grupo de neoplasias malignas que envolvem os linfonodos,

podendo, muitas vezes, invadir o sangue periférico e a medula óssea. Os linfonodos são estruturas encapsuladas por um tecido conectivo denso, que se projeta para o interior do órgão formando trabéculas. A parte periférica do interior dos linfonodos é denominada de córtex e é altamente celular, ao passo que a área mais central é chamada de medula e tem uma menor celularidade. O espaço subcapsular é formado por uma rede denominada de seios corticais e seios medulares, dispostos no córtex e na medula, respectivamente.<sup>4,11</sup> No córtex periférico do linfonodo, estão localizados os folículos primários, que são agregados esféricos de tecido linfoide e constituídos, principalmente, por linfócitos pequenos, os quais sofrem proliferação e diferenciação após estímulos antigênicos, formando os folículos secundários, também denominados de centros germinativos. Tanto os folículos primários quanto o centro germinativo são ocupados, em grande parte, por linfócitos B, caracterizando os sítios de produção de imunoglobulinas. No centro germinativo, dois tipos de linfócitos B são observados: os centroblastos e os centrócitos, sendo os primeiros células grandes e ativadas, ocupando a área mais central do centro germinativo, e os segundos, derivados dos centroblastos, são células pequenas e que ocupam a zona mais apical ou periférica. Estão presentes também no centro germinativo os linfócitos T, com imunofenótipo compatível com a subpopulação Th2 (CD4+, CD45RO+ e CD57+), os quais são ativados pela apresentação de antígenos fagocitados pela grande quantidade de macrófagos presentes nas paredes dos sinusoides. Além dos macrófagos, as células dendríticas também se encontram presentes nos linfonodos; aquelas presentes nos folículos são as células dendríticas foliculares, e as presentes no córtex são as células dendríticas interdigitais. Essas células desempenham um papel na geração de células de memória, formação de plasmócitos e produção de imunoglobulinas.

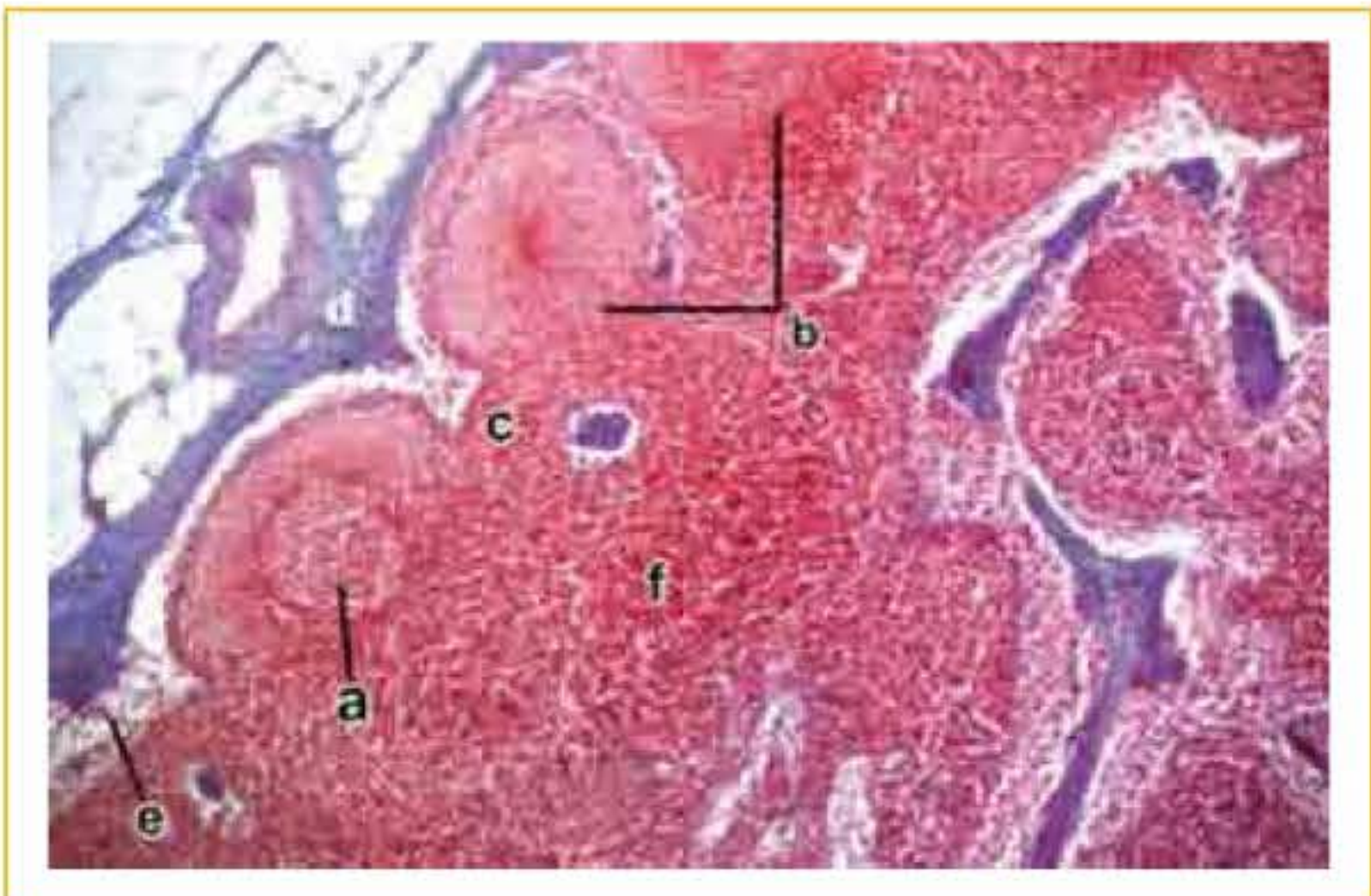
Na medula, estão localizados agregados de linfócitos dispostos em forma de cordões (cordões medulares), entre os quais se encontram, predominantemente, as células plasmáticas (**Figuras 11.43 e 11.44**).

Os linfomas podem aparecer em qualquer idade, porém são mais comuns em adultos do que em crianças e em homens do que em mulheres (proporção aproximada de 2:1, nesse último). Clínica-





**FIGURA 11.43** Representação esquemática da estrutura do linfonodo.

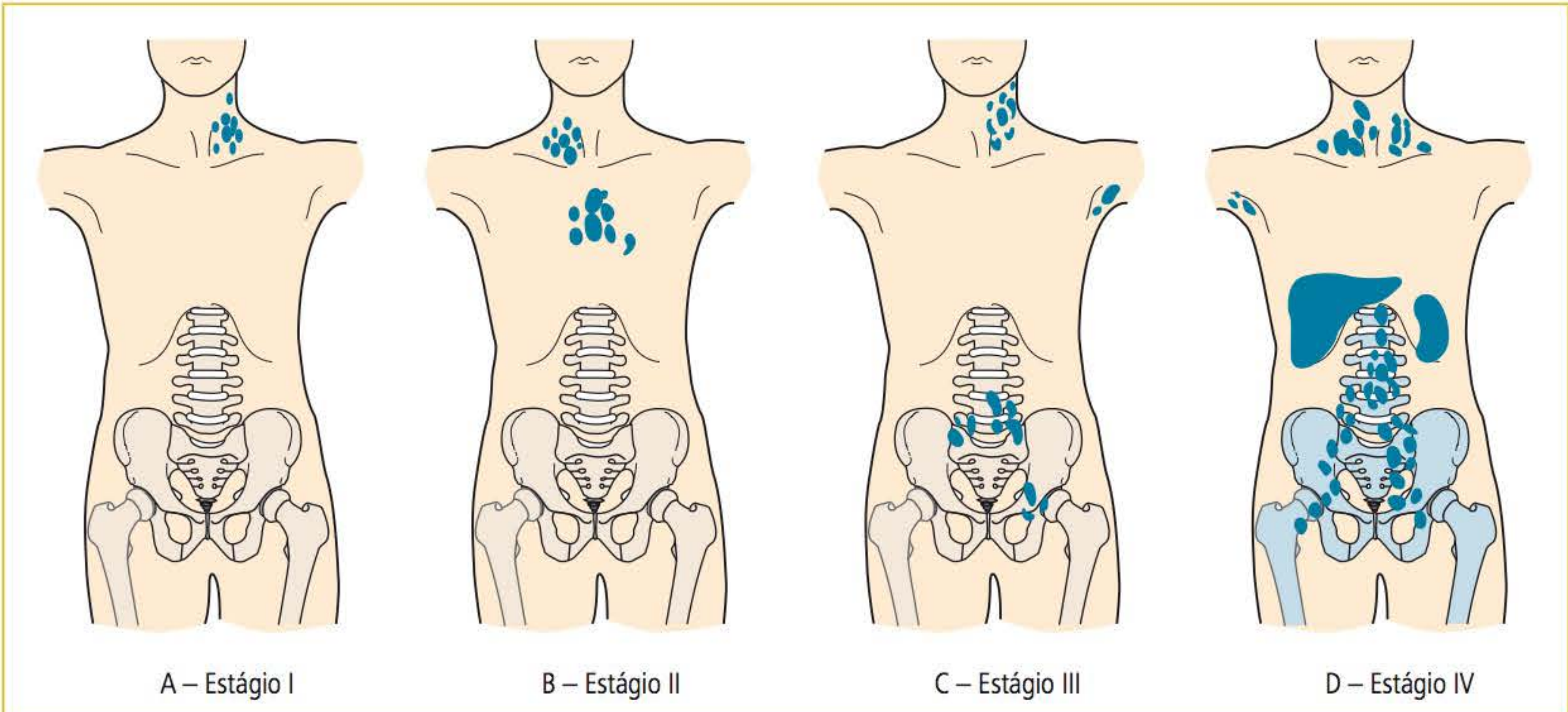


**FIGURA 11.44** Corte histológico de um linfonodo. a) centro germinativo; b) folículos; c) córtex; d) cápsula; e) espaço subcapsular; f) medula (72).

mente, manifestam-se com o aparecimento de linfadenomegalia assimétrica periférica ou não, sendo, em 60 a 70% dos casos, comprometidos os linfonodos cervicais, 10 a 15%, linfonodos axilares e 6 a 12%, os linfonodos inguinais. Linfonodos retroperitoneais também podem estar envolvidos; nesses casos, o diagnóstico é mais difícil. A doença pode progredir por contiguidade e por meio do sistema linfático, comprometendo outros linfonodos e determinando um estágio mais avançado, levando-se em consideração o número de linfonodos invadidos e se esses se encontram no mesmo lado da origem, supradiaphragmático ou infradiaphragmático (sistema de estadiamento de linfomas, **Figura 11.45**). Em aproximadamente 10% dos casos de linfomas, o mediastino também pode estar envolvido, além de outros órgãos ou tecidos, como medula óssea, trato gastrointestinal, ossos, pulmões e sistema nervoso, entre outros.<sup>40</sup>

São acrescidos ainda ao estadiamento a ausência (A) ou presença (B) de um ou mais dos seguintes sinais e sintomas clínicos: febre superior a 38° C e de origem desconhecida, sudorese noturna e perda de peso (> 10% do peso em seis meses).

Embora ainda sejam classificados em linfomas de Hodgkin (LH) e linfomas não Hodgkin (LNH), essa classificação sofreu importantes modificações após as revisões de 2001 e 2008 da OMS, em que, além dos aspectos morfológicos, foram incorporados outros critérios diagnósticos, como a imunofenotipagem, a genética, a biologia molecular e os



**FIGURA 11.45** Estadiamento clínico dos linfomas: (A) Estágio I; (B) Estágio II; (C) Estágio III; (D) Estágio IV.

Fonte: Hoffbrand e Moss.<sup>40</sup>



aspectos clínicos da doença. Dessa forma, é possível estratificar esse grupo de neoplasias de acordo com a linhagem linfocitária envolvida, bem como a origem, se de células precursoras ou maduras.<sup>40,82</sup> Portanto, de acordo com essa revisão, a classificação dos linfomas ficou determinada da seguinte

forma: neoplasias de células B maduras (**Quadro 11.21**); neoplasias de células T e NK maduras (**Quadro 11.22**); linfomas de Hodgkin (**Quadro 11.23**); neoplasias histiocitárias e dendríticas (**Quadro 11.24**) e distúrbios linfoproliferativos pós-transplante (DLPT) (**Quadro 11.25**).

QUADRO 11.21 Neoplasias de células B maduras – classificação das neoplasias linfoides	
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Leucemia linfocítica crônica/linfoma de células pequenas</li><li>▪ Leucemia pró-linfocítica de células B</li><li>▪ Linfoma esplênico de células B da zona marginal</li><li>▪ Leucemia de células pilosas (células cabeludas/<i>hairy cell</i>)</li><li>▪ Leucemia/linfoma de células B, inclassificável</li><li>▪ Linfoma linfoplasmocítico (macroglobulinemia de Waldenström)</li><li>▪ Doenças de cadeias pesadas (doenças de cadeias <math>\alpha</math>, <math>\gamma</math>, <math>\mu</math>)</li><li>▪ Mieloma plasmocítico (mieloma múltiplo)</li><li>▪ Plasmocitoma solitário de osso</li><li>▪ Plasmocitoma extraósseo</li><li>▪ Linfoma extranodal da zona marginal da MALT</li><li>▪ Linfoma nodal da zona marginal</li><li>▪ Linfoma folicular</li><li>▪ Linfoma centrofolicular primário cutâneo</li><li>▪ Linfoma de células do manto</li><li>▪ Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG)<ul style="list-style-type: none"><li>– Não especificado separadamente (NOS)</li></ul></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Linfoma de células B grandes rico em células T/histiócitos</li><li>– LDCBG EBV-positivo do idoso</li><li>– LDCBG associado com inflamação crônica</li><li>▪ Granulomatose linfomatoide</li><li>▪ Linfoma de células B grandes primário mediastinal (tímico)</li><li>▪ Linfoma de células B grandes intravascular</li><li>▪ LDCBG primário cutâneo</li><li>▪ Linfoma anaplásico de células B grandes ALK-positivo</li><li>▪ Linfoma plasmoblástico</li><li>▪ Linfoma primário de efusão</li><li>▪ Linfoma de células B grandes originado de doença de Castleman multicêntrica associada a HHV-8</li><li>▪ Linfoma de Burkitt</li><li>▪ Linfoma de células B inclassificável, com aspectos intermediários entre LDCBG e linfoma de Burkitt</li><li>▪ Linfoma de células B inclassificável, com aspectos intermediários entre LDCBG e linfoma de Hodgkin clássico</li></ul>

Fonte: Campo e colaboradores.<sup>82</sup>

QUADRO 11.22 Neoplasias de células T e NK maduras – classificação das neoplasias linfoides	
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Leucemia pró-linfocítica de células T</li><li>▪ Leucemia de linfócitos T grandes e granulares</li><li>▪ Leucemia agressiva de células NK</li><li>▪ Doença linfoproliferativa sistêmica</li><li>▪ (EBV-positiva de células T da infância – associada à infecção EBV crônica ativa)</li><li>▪ Linfoma cutâneo vaciniforme (tipo hidroa)</li><li>▪ Leucemia/linfoma de células T do adulto</li><li>▪ Linfoma extranodal de células NK/T, tipo nasal</li><li>▪ Linfoma de células T associado à enteropatia</li><li>▪ Linfoma de células T hepatoesplênico</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Linfoma de células T subcutâneo paniculitiforme</li><li>▪ Micose fungoide</li><li>▪ Síndrome de Sézary</li><li>▪ Linfoma anaplásico de células grandes primário cutâneo</li><li>▪ Linfoma primário cutâneo de células T</li><li>▪ Linfoma de células T <math>\gamma\delta</math> primário cutâneo</li><li>▪ Linfoma de células T pequenas/médias (CD4+ cutâneo primário)</li><li>▪ Linfoma de células T periféricas, não especificadas separadamente (NOS)</li><li>▪ Linfoma angioimunoblástico de células T</li><li>▪ Linfoma anaplásico de células grandes ALK-positivo</li><li>▪ Linfoma anaplásico de células grandes ALK-negativo</li></ul>

Fonte: Campo e colaboradores.<sup>82</sup>

QUADRO 11.23 Linfoma de Hodgkin – classificação das neoplasias linfoides
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Linfoma de Hodgkin nodular com predomínio linfocítico</li><li>▪ Linfoma de Hodgkin clássico<ul style="list-style-type: none"><li>– Linfoma de Hodgkin clássico com esclerose nodular</li><li>– Linfoma de Hodgkin clássico com riqueza linfocítica</li><li>– Linfoma de Hodgkin clássico com celularidade mista</li><li>– Linfoma de Hodgkin clássico com depleção linfocítica</li></ul></li></ul>

Fonte: Campo e colaboradores.<sup>82</sup>

QUADRO 11.24 Neoplasias histiocitárias e dendríticas – classificação das neoplasias linfoides
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Sarcoma histiocitário</li><li>▪ Histiocitose de células de Langerhans</li><li>▪ Sarcoma de células de Langerhans</li><li>▪ Sarcoma de células dendríticas interdigitantes</li><li>▪ Sarcoma folicular de células dendríticas</li><li>▪ Tumor de células dendríticas, não especificado separadamente (NOS)</li><li>▪ Tumor de células dendríticas indeterminadas</li><li>▪ Tumor de células reticulares fibroblásticas</li></ul>

Fonte: Campo e colaboradores.<sup>82</sup>



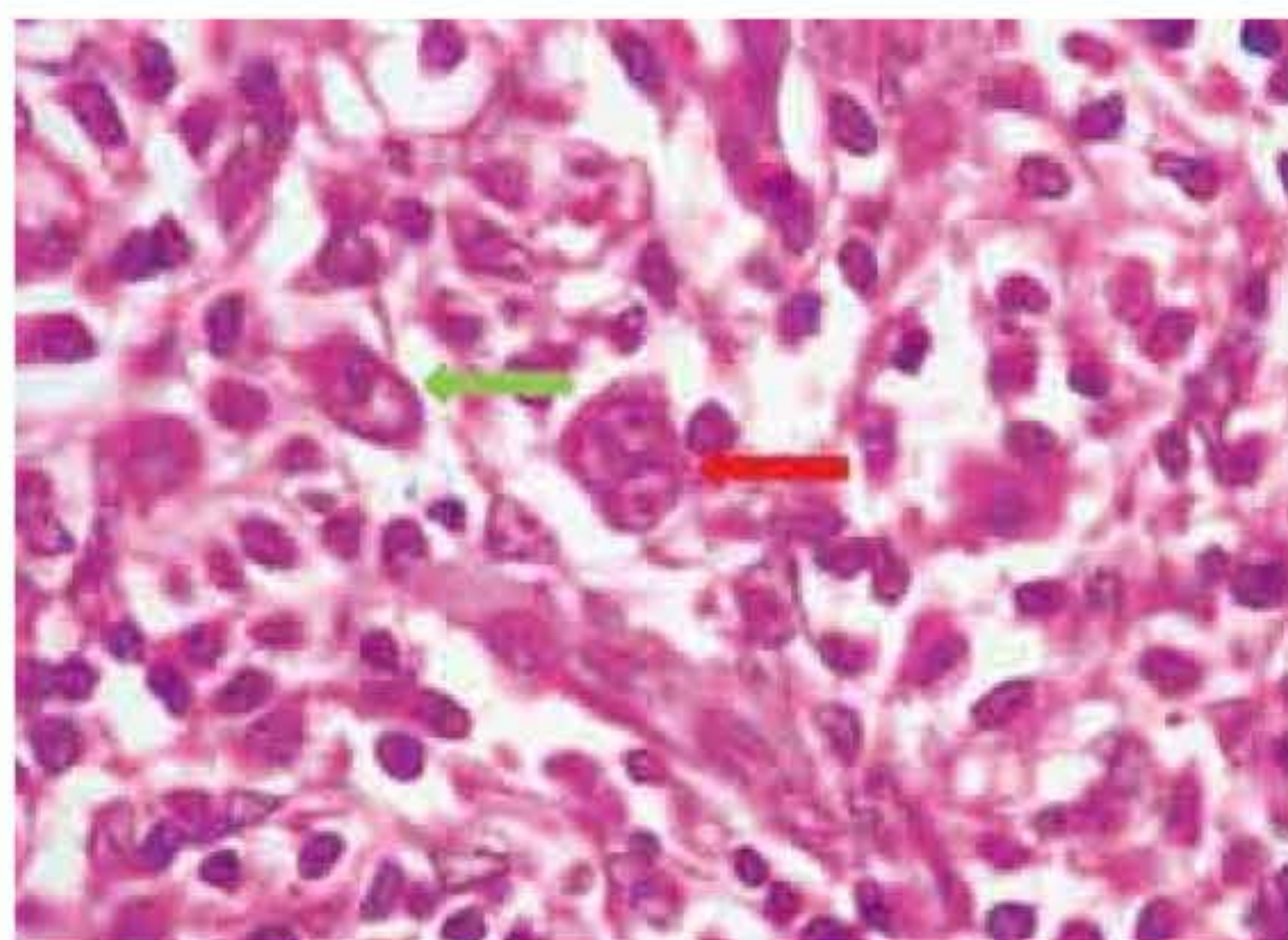
**QUADRO 11.25** Distúrbios linfoproliferativos pós-transplante – classificação das neoplasias linfoides

- Lesões precoces
  - Hiperplasia plasmocítica reacional semelhante à mononucleose infecciosa
- DLPT polimórfica
- DLPT monomórfica (tipos celulares B e T/NK)
- DLPT do tipo linfoma de Hodgkin clássico

Fonte: Campo e colaboradores.<sup>82</sup>

**Linfoma de Hodgkin (LH)**

Os aspectos macroscópicos da doença foram descritos primeiramente por Thomas Hodgkin, em 1832. As características histológicas vieram depois, principalmente pelas observações de Carl Sternberg, em 1898, e Dorothy Reed, em 1902, os quais descreveram com detalhes a presença de células muito grandes em meio a linfócitos, sendo essas células grandes chamadas posteriormente de células de Reed-Sternberg (RS). A presença das células de Reed-Sternberg e suas variantes neoplásicas juntamente com as células de Hodgkin (CH) é critério morfológico obrigatório para a caracterização do linfoma de Hodgkin. As células de RS podem ser descritas morfolologicamente como células de grande tamanho, multinucleadas ou com o núcleo bilobado, onde se encontram nucléolos proeminentes e eosinofílicos. A cromatina nuclear que circunda os nucléolos é mais clara (vesiculosa), dando o aspecto a essa célula de “olho de coruja”, como é comumente conhecida (**Figura 11.46**).<sup>5,40,43,83</sup>



**FIGURA 11.46** Célula de Reed-Sternberg (“olho de coruja” – seta vermelha), e célula de Hodgkin (seta verde, linfoma de Hodgkin).

É classificado, atualmente, em dois grandes grupos: linfoma de Hodgkin com predominância

linfocitária medular (5% dos casos) e linfoma de Hodgkin clássico (95% dos casos). O LH clássico é dividido ainda em quatro subgrupos, na seguinte ordem aproximada de prevalência: esclerose medular (70%), celularidade mista (20%), depleção linfocitária (5%) e rico em linfócitos (5%) (**Quadro 11.23**).<sup>83</sup>

O diagnóstico de LH é feito pelo exame histopatológico de linfonodos comprometidos, no qual se evidencia a presença das células RS e suas variações, bem como as células de Hodgkin (células mononucleares grandes – **Figura 11.46**). O hemograma pode mostrar, de forma comum, anemia normocítica e normocrômica, podendo estar presente reação leucoeritroblástica. Embora neutrofilia, eosinofilia e plaquetas normais ou elevadas sejam comuns na fase inicial da doença, na fase tardia são comuns citopenias, incluindo linfopenia. Marcadores inflamatórios séricos, como a proteína C reativa (PCR) e a velocidade de hemossedimentação (VHS), estão elevados, tendo os mesmos importante valor no monitoramento da atividade da doença. Em aproximadamente 30 a 40% dos casos, a desidrogenase láctica (LDH) também se encontra aumentada.<sup>5,40,43,83</sup>

**Linfomas não Hodgkin (LNH)**

Sua prevalência é maior quando comparada com os LH, envolvendo, em 85% dos casos, linfócitos B (neoplasias de células B maduras) e, em 15%, linfócitos T ou NK (neoplasias de células T maduras) (**Quadros 11.21 e 11.22**). Quanto ao seu comportamento, evolui significativamente com doença extranodal, podendo ainda ser classificado, levando-se em consideração a velocidade proliferativa, em baixo grau (crescimento lento ou indolente) e alto grau (crescimento rápido e agressivo). A sua frequência tem aumentado muito nos últimos 50 anos, principalmente em países desenvolvidos e/ou industrializados, estando entre as cinco neoplasias mais comuns nesses locais.<sup>5,40,82,84</sup>

Quanto à etiologia dos LNHs existe uma significativa correlação com alguns agentes infecciosos virais, bacterianos e protozoários, principalmente em regiões endêmicas desses agentes (**Tabela 11.18**).

Fatores citogenéticos, principalmente translocações cromossômicas, são as causas mais comuns dos LNHs e, juntamente com as características imunofenotípicas, determinam importante valor diagnóstico e prognóstico (**Tabela 11.19**).



TABELA 11.18 Principais agentes infecciosos associados aos linfomas não Hodgkin	
AGENTE	TIPO DE LINFOMA
VÍRUS	
HTLV-1	Leucemia/linfoma de células T do adulto
Epstein-Barr Vírus (EBV)	Linfoma de Burkitt Linfoma de Hodgkin Distúrbio linfoproliferativo pós-transplante
HHV-8	Linfoma primário de efusão Doença de Castleman multicêntrica
HIV-1	Linfoma de células B de alto grau Linfoma primário do SNC Linfoma de Hodgkin
Hepatite C	Linfoma da zona marginal
BACTÉRIAS	
<i>Helicobacterpylori</i>	Linfoma gástrico (MALT)
PROTOZOÁRIOS	
<i>Plasmodiumsp</i>	Linfoma de Burkitt

SNC, sistema nervoso central; MALT, tecido linfoide associado à mucosa.

TABELA 11.19 Correlação entre os achados citogenéticos e imunofenótipos e os tipos de LNH de células B							
	Igs	CD5	CD10	CD20	CD23	BCL-2	CITOGENÉTICA
Linfoplasmocítico	+/-	-	-	+	-	+	Sem achados específicos
MALT	+	-	-	+	+/-	+	t(1;14)
Folicular	+	-	+	+	+/-	+	t(14;18)
Células do manto	+	+	-	+	-	+	t(11;14)
LDCBG	+/-	-	+/-	+	-	+/-	t(3;14); t(14;18)
Linfoma de Burkitt	+	-	+	+	-	-	t(8;14); t(2;8); t(8;22)

IgS, imunoglobulina de superfície; MALT, tecido linfoide associado à mucosa; LDCBG, linfoma difuso de células B grandes.

Fonte: Adaptada de Hoffbrand e Moss.<sup>40</sup>

As manifestações clínicas dos LNHs são similares ao LH, porém, em geral, dependentes do grau de comprometimento da medula óssea, local mais comum de doença extranodal, e do comprometimento de outros locais ou órgãos como fígado, baço, linfonodos retroperitoneais e mesentéricos. Anemia e infecções por agentes oportunistas, devido à neutropenia e à diminuição da imunidade, são frequentes e, no hemograma, também pode ser encontrada trombocitopenia e reação leucoeritoblástica. Células linfomatosas, eventualmente, podem ser vistas no sangue periférico. A LDH sérica se encontra elevada nos casos, principalmente, de LNH de alto grau ou de crescimento rápido, podendo, portanto, ser utilizado esse parâmetro como indicador prognóstico.

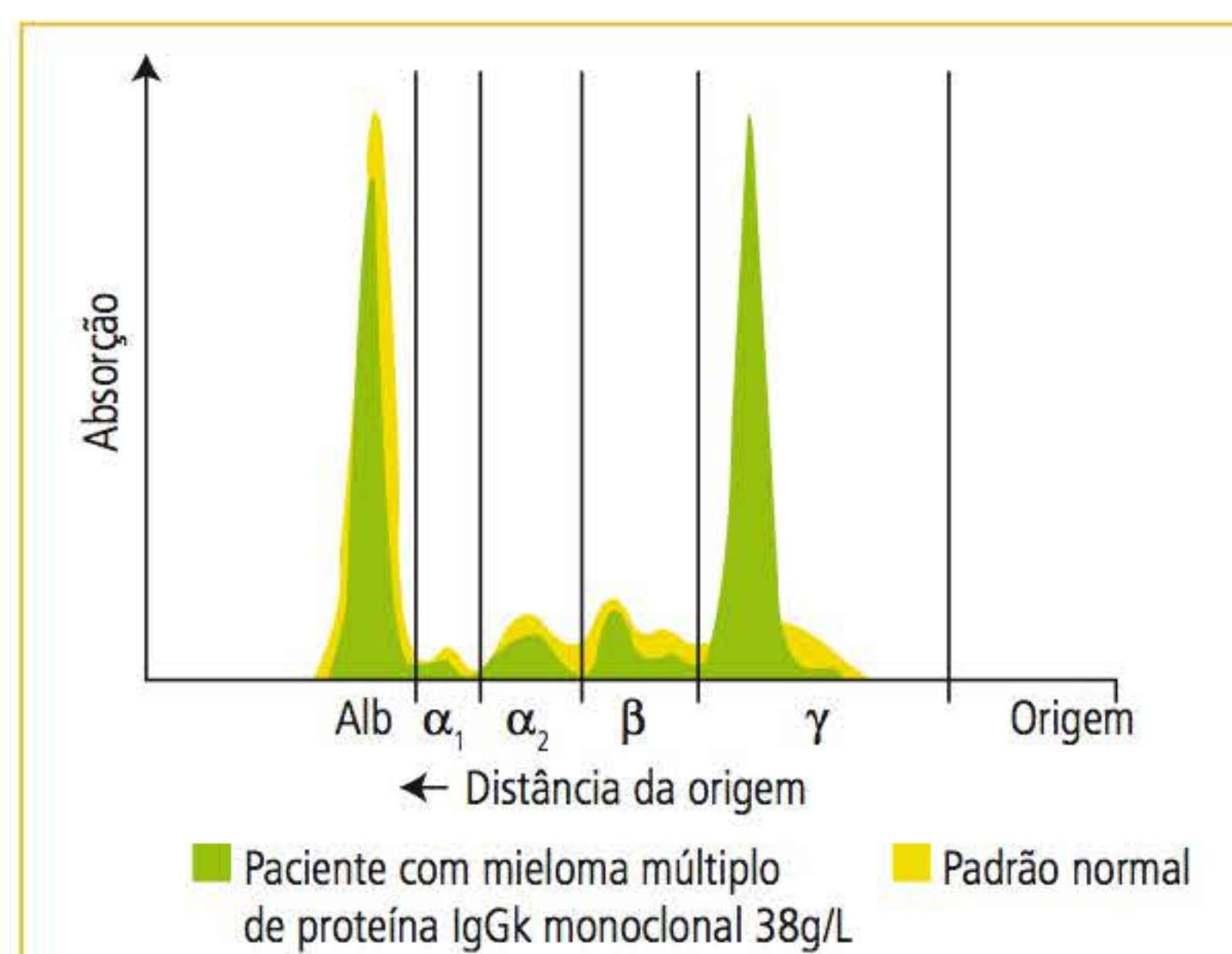
⚡ MIELOMA MÚLTIPLO

O mieloma múltiplo (MM) constitui uma neoplasia maligna dos plasmócitos com proliferação clonal, em que o tumor, seus produtos e a resposta do hospedeiro determinam várias disfunções orgânicas e sintomas, como dor óssea com ou sem fratura, insuficiência renal, suscetibilidade a infecções, anemia, hipercalcemia, distúrbios da coagulação e manifestações clínicas relacionadas à hiperviscosidade. Embora sua causa seja ainda desconhecida, a associação da doença com alterações cromossômicas já pode ser observada, entre as principais a del13q14, del17p13, anormalidades 11q, t(11;14)(q13;q32) e t(4;14)(p16;q32). Em algumas situações, foram observadas uma expressão



excessiva dos genes *MYC* ou *RAS* e mutações nos genes *p53* e *pRb-1*.<sup>85</sup>

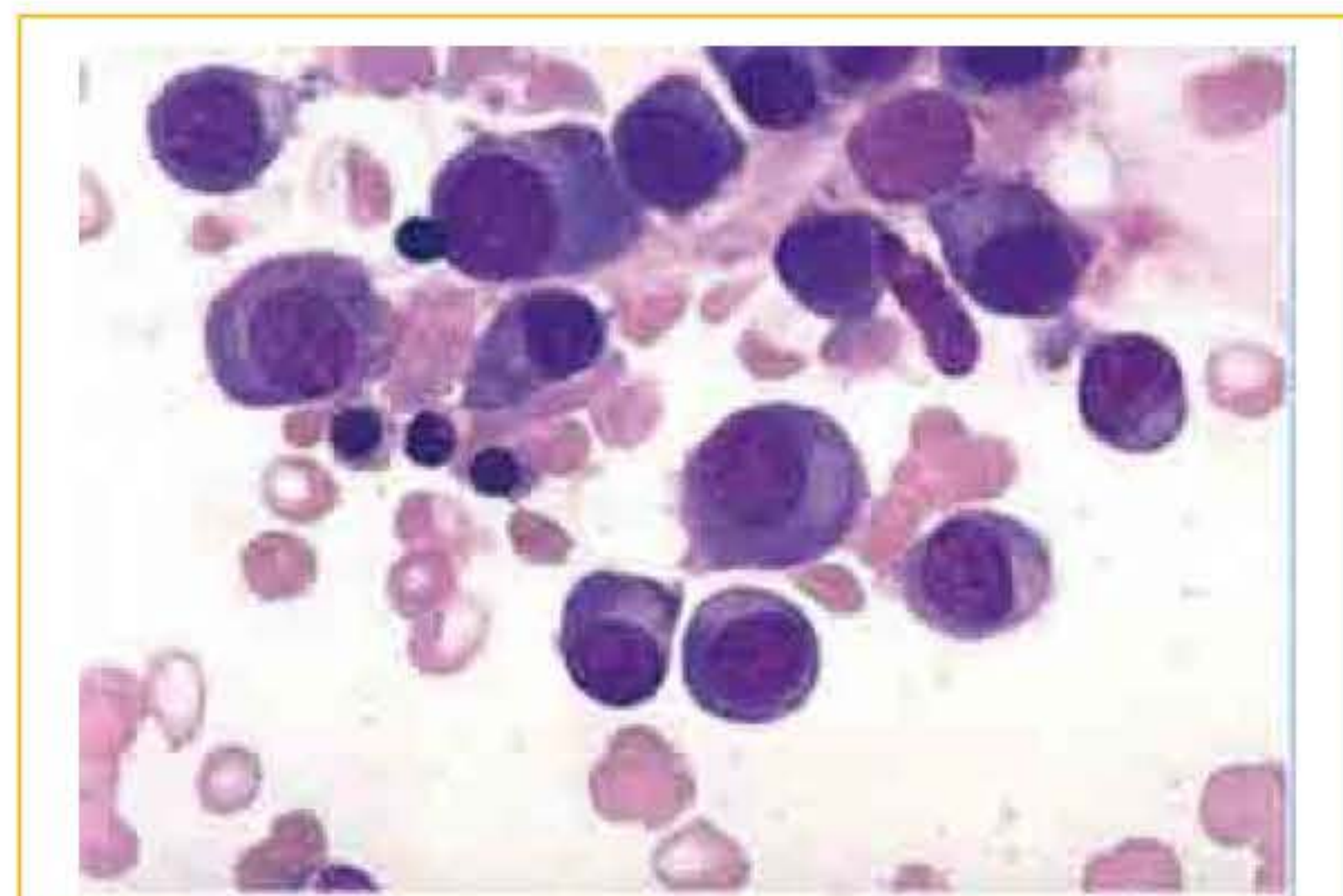
As células plasmáticas malignas são denominadas de células do mieloma múltiplo (CMM) e são células hiperprodutoras de imunoglobulina monoclonal denominada de proteína M ou paraproteína presente no plasma e na urina (IgG em 60% dos casos, IgA em 20%, IgD e IgM em 1%). Embora cadeias leves kappa (k) e lambda (λ) estejam presentes em praticamente todos os casos, em aproximadamente 20% desses, apenas cadeias leves estão presentes no plasma e também na urina) (Figura 11.47).



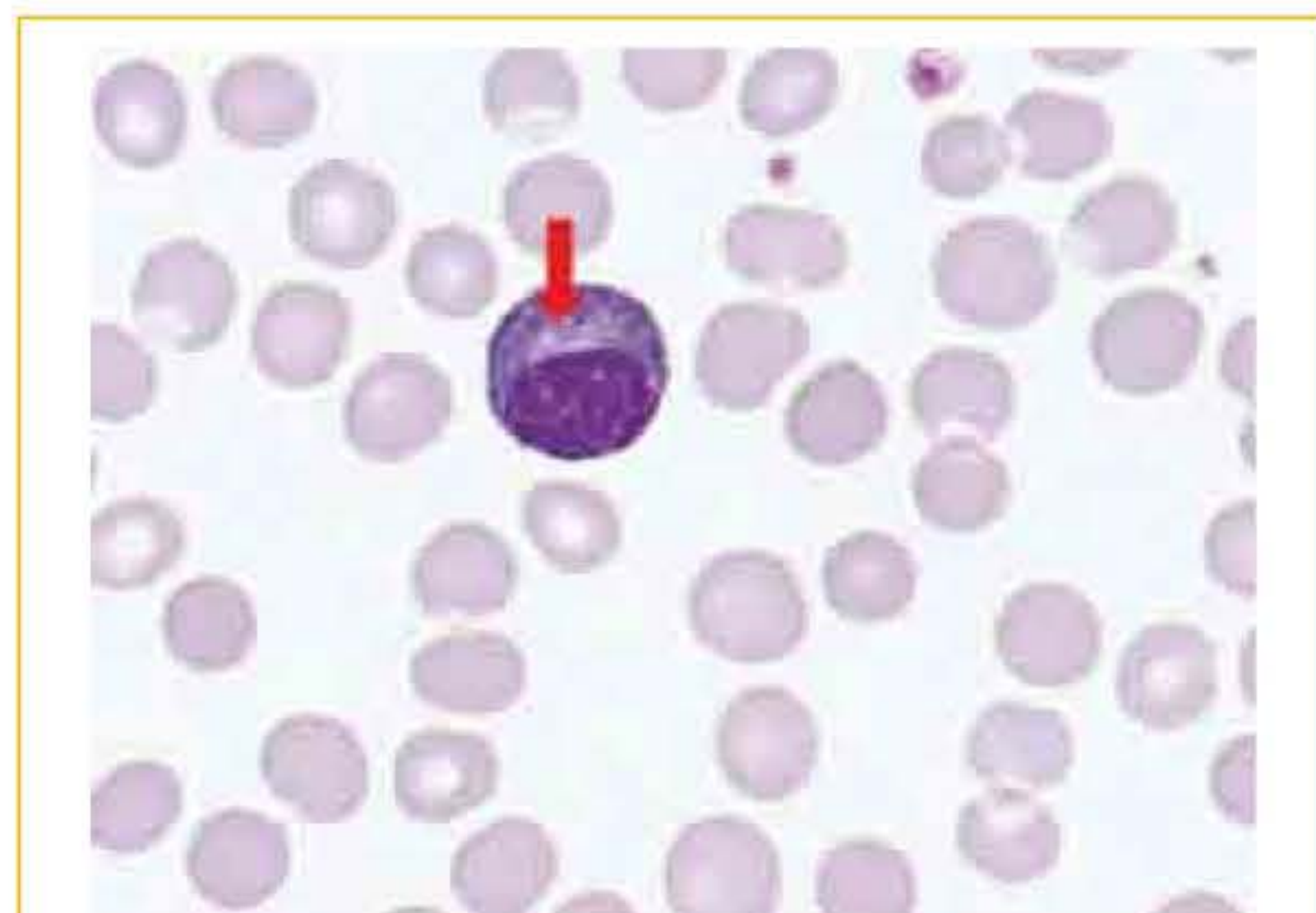
**FIGURA 11.47** Eletroforese de proteínas demonstrando pico de gamaglobulinas em paciente com mieloma múltiplo.

A proliferação plasmocitária se deve, principalmente, a uma maior migração dessas células do tecido linfóide periférico para a medula óssea e a uma eficiente interação entre as CMMs e o estroma medular, por meio da expressão de moléculas de adesão, as quais proporcionam uma resposta mais eficaz aos fatores de crescimento e citocinas. A proliferação das células tumorais também é responsável pela substituição da medula óssea normal pela neoplásica e pela ativação e supressão dos osteoclastos. Todos esses fatores são determinantes na expressão da doença (Figuras 11.48 a 11.50).<sup>85,86</sup>

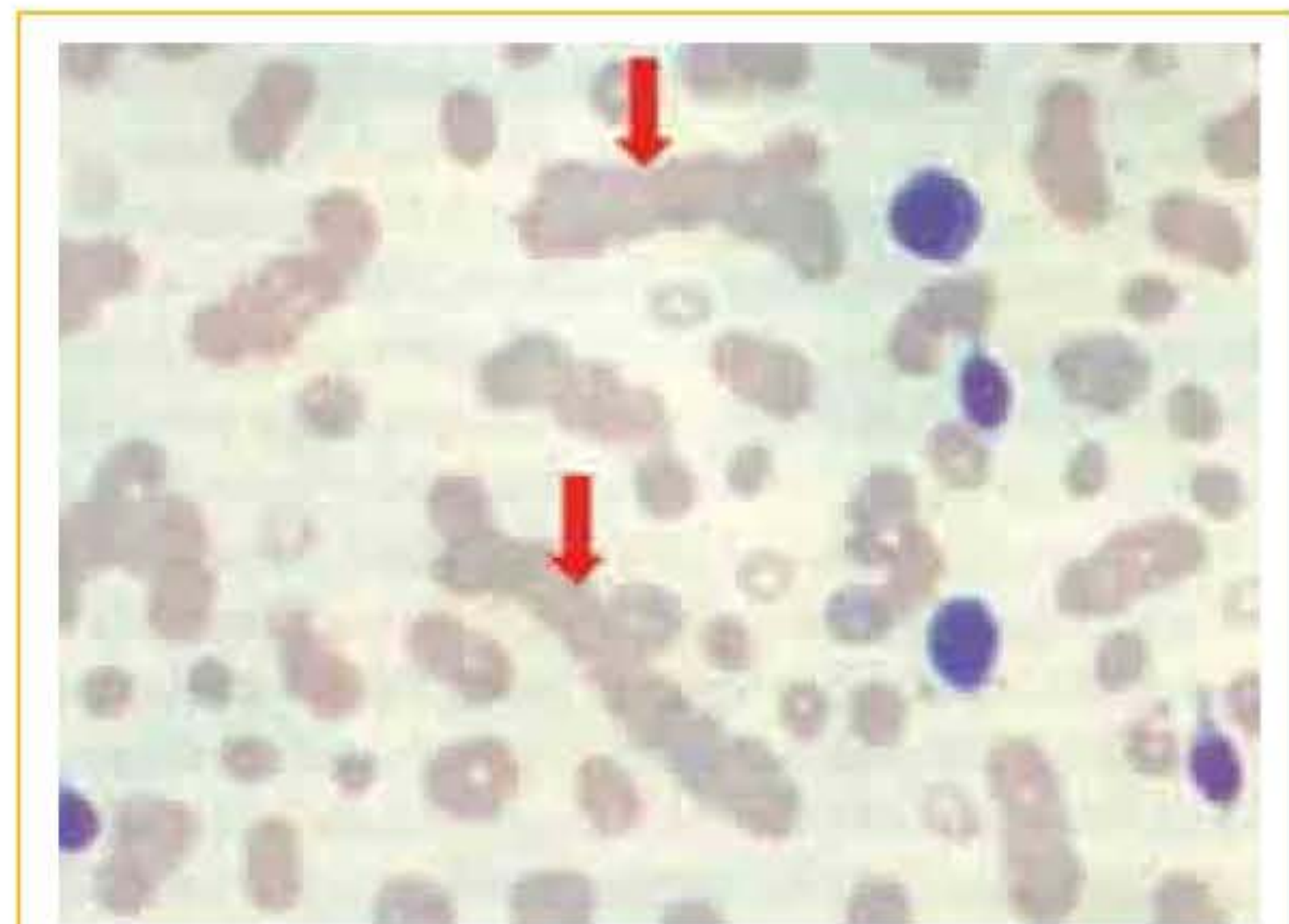
A incidência da doença é semelhante no mundo todo, sendo de aproximadamente quatro casos/100 mil habitantes/ano, com maior pico após a sexta década de vida (idade média de 68 anos) e raramente antes dos 40 anos. Incide mais em negros do que em brancos (duas vezes maior), sendo os homens mais comumente afetados do que as mulheres.<sup>40,85,86</sup>



**FIGURA 11.48** Numerosos plasmócitos na medula óssea, MM.



**FIGURA 11.49** Plasmócito circulante. Observar as características morfológicas: intensa basofilia citoplasmática, núcleo periférico (excêntrico) e espaço claro perinuclear – Complexo de Golgi (seta).



**FIGURA 11.50** Rouleaux eritrocitário em paciente com mieloma múltiplo (setas).

O diagnóstico pode ser efetivado pela presença da tríade clássica do MM: presença de plasmócitos na medula óssea superior a 10% (plasmócitos



CD138+ e monoclonais), proteína M no plasma e/ou na urina e danos decorrentes a tecidos ou órgãos, como lesões osteolíticas, insuficiência renal, hipercalcemia e anemia. O diagnóstico diferencial deve ser feito, principalmente, de gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS – *monoclonal gammopathy of undetermined significance*), as quais, com o tempo, podem, eventualmente, evoluir para MM.<sup>40,85,86</sup>

Os achados laboratoriais encontrados no MM são importantes não só para o diagnóstico da doença, mas também para o estadiamento e monitoramento desses pacientes (**Quadro 11.26, Tabelas 11.20 a 11.22**).

**MACROGLOBULINEMIA DE WALDESTRÖM**

A macroglobulinemia de Waldeström (MW) é uma doença maligna de células linfoplasmocitoides, oriunda de células B do centro pós-germinal, que sofreram mutações somáticas e seleção antigênica no folículo linfoide, determinando características de uma célula B de memória produtora de IgM. Embora possua incidência, prevalência e evolução clínica semelhantes ao MM, difere dessa doença por apresentar linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, síndrome de hiperviscosidade acentuada (pela presença sérica elevada de componente M, do tipo IgM, acima de 3 g/dL), neuropatia periférica e ausência de lesões ósseas e de hipercalcemia. Rara-

**QUADRO 11.26** Principais achados laboratoriais nos pacientes portadores de mieloma múltiplo

<b>Bioquímicos/imunológicos (soro/plasma)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Hiperproteinemia</li><li>▪ Hipercalcemia</li><li>▪ Creatinina sérica elevada (20% dos casos)</li><li>▪ <math>\beta_2</math> – microglobulina sérica elevada (importante preditor prognóstico: &lt; 0,35 mg/dL = melhor prognóstico / &gt; 0,55 mg/dL = pior prognóstico)</li><li>▪ Presença de proteína M (paraproteína) IgG, IgA, IgD, IgM (eletroforese)</li><li>▪ Cadeias leves k e <math>\lambda</math> aumentadas, predominando geralmente uma sobre a outra</li><li>▪ Níveis de imunoglobulinas séricas normais ou diminuídos</li></ul>
<b>Hematológicos (sangue periférico)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Anemia geralmente normocítica e normocrômica ou levemente macrocítica</li><li>▪ Neutropenia e plaquetopenia (mais comum na doença avançada)</li><li>▪ Presença de plasmócitos (linfócitos atípicos plasmocitoides)</li><li>▪ <i>Rouleaux</i> eritrocitário</li><li>▪ VHS muito elevado</li></ul>
<b>Hematológicos (medula óssea)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Plasmócitos &gt; 20%</li><li>▪ Presença de plasmócitos com formas anormais ou atípicas</li><li>▪ Imunofenótipo maligno: CD38+ (alto); CD138+ (alto); CD54 (baixo)</li></ul>
<b>Urina</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Presença de cadeias leves k e <math>\lambda</math></li><li>▪ Proteinúria de Bence Jones</li></ul>

**TABELA 11.20** Sistema de estadiamento de Durie-Salmon para mieloma múltiplo – aspectos clínicos e laboratoriais

ESTÁGIO	CRITÉRIOS	CARGA TUMORAL ESTIMADA (X 10 <sup>12</sup> CÉLULAS/M <sup>2</sup> )
I	Todos os seguintes: 1. Hb> 10 g/dL 2. Ca <sup>++</sup> sérico < 12 mg/dL 3. RX de osso normal ou lesão solitária 4. Baixa produção de componente M a. IgG < 5 g/dL b. IgA < 3 g/dL c. Cadeia leve (urina) < 4 g/24 h	0,6 (baixa)
II	Padrões diferentes dos estágios I e II	0,6 a 1,2 (intermediária)
III	Um ou mais dos seguintes: 1. Hb< 8,5 g/dL 2. Ca <sup>++</sup> sérico > 12 mg/dL 3. Lesões osteolíticas avançadas 4. Alta produção de componente M a. IgG > 7 g/dL b. IgA > 5 g/dL c. Cadeia leve (urina) > 12 g/24 h	> 1,2 (elevada)



TABELA 11.21 Subclassificação pelos níveis de creatinina sérica x sobrevida em meses		
NÍVEL	ESTÁGIO	SOBREVIDA MÉDIA (MESES)
A (< 2 mg/dL)	IA	61
B (> 2 mg/dL)	IIA, IIB	55
	IIIA	30
	IIIB	15

TABELA 11.22 Sistema de estadiamento internacional do mieloma múltiplo		
NÍVEIS SÉRICOS (β <sub>2</sub> M, ALBUMINA)	ESTÁGIO	SOBREVIDA MÉDIA (MESES)
β <sub>2</sub> M < 3,5 mg/dL, albumina ≥ 3,5 g/dL	I (28%)	62
β <sub>2</sub> M < 3,5 mg/dL, albumina < 3,5 g/dL ou β <sub>2</sub> M = 3,5 a 5,5	II (39%)	44
β <sub>2</sub> M > 5,5	III (33%)	29

β<sub>2</sub>M, β<sub>2</sub>, microglobulina; %, pacientes presentes em cada estágio.

mente, evoluem para insuficiência renal, porque há pouca excreção renal devido a apresentarem paraproteína do tipo IgM e ser essa uma imunoglobulina de grande tamanho. Em apenas 20% dos casos, ocorre a presença de cadeias leves k e λ, predominando em 85% dos casos a primeira. Cerca de 10% da MW são crioglobulinas, obrigando o diagnóstico diferencial da presença pura de crioglobulinas (doença não neoplásica), já que, em ambos os casos, o fenômeno de Raynaud poderá estar presente.<sup>85</sup>

Laboratorialmente, pode ser observada a presença de anemia normocítica e normocrômica, *rouleaux* eritrocitário e VHS elevado, podendo ter Coombs positivo em alguns casos. A presença de linfócitos malignos pequenos (com imunofenótipo CD19+, CD20+, CD22+, IgMc, CD138-) na medula óssea e no sangue periférico é um achado bastante comum. As contagens de plaquetas e de leucócitos geralmente se encontram dentro dos valores de referência. A fixação de imunoglobulinas nas membranas das plaquetas e a interação dessas moléculas com os fatores de coagulação poderão interferir na função normal desses elementos, sendo responsável, muitas vezes, por episódios hemorrágicos nos portadores de MW.<sup>85</sup>

⚡ HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA (HPN)

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença clonal de célula-tronco com deficiên-

cia na síntese de moléculas de ancoragem para o fosfatidil-inositol-glicano (GPI) de classe A, a qual ocorre devido a mutações somáticas nessas células hematopoiéticas.

O termo hemoglobinúria significa a presença de hemoglobina na urina, que se faz presente quando acontece hemólise intravascular. Na HPN ocorre crise hemolítica intravascular durante o sono, principalmente devido à lise eritrocitária provocada pela ação do complemento e pela formação anômala dos eritrócitos; as duas situações acarretam a presença de hemoglobinúria na primeira urina da manhã.

O gene que codifica a fosfatidil-inositol-glicano de classe A é chamado de *PIG-A123* e está localizado no cromossomo X (Xp22.1).<sup>12</sup> Ao GPI aderem-se várias proteínas, como a *DAF* (*decay accelerating factor* – CD55) e a *MIRL* (*membrane inhibitor of reactive lysis* – CD59).<sup>12</sup> A *DAF* é uma proteína que inibe a formação e a estabilidade das convertases de C3, e a *MIRL* faz a inibição direta da hemólise pelo complemento, sendo essas, portanto, as principais causas de hemólise.<sup>11,86</sup> As células da HPN apresentam três fenótipos: células do tipo I, que apresentam expressão normal de GPI, células do tipo II, que apresentam uma expressão intermediária de GPI, e células do tipo III, que não expressam GPI.<sup>86</sup> As células do tipo III não apresentam expressão de *DAF* e *MIRL*, e as células do tipo II apresentam uma expressão parcial de *DAF* e *MIRL*.<sup>11,86</sup>

Os neutrófilos dos pacientes com HPN são deficientes em fosfatase alcalina, e a primeira proteína deficiente descrita em eritrócitos foi a acetilcolinesterase.<sup>11,86</sup>

Muitas vezes, a hemólise pode ser iniciada a partir de processos infecciosos, cirurgias, após exercício físico vigoroso e após a injeção de contrastes. Os pacientes apresentam um quadro de hemólise crônica e podem fazer um quadro de anemia ferropriva devido à perda de ferro pela urina na forma de hemoglobinúria e hemossiderinúria. Os pacientes podem apresentar sangramentos em decorrência da trombocitopenia e há uma correlação entre episódios trombóticos e HPN. A causa da trombose pode ser pela ativação das plaquetas pelo complemento ou pela liberação intravascular de ADP (adenosina difosfato – agente agonista da agregação plaquetária) pelos eritrócitos.<sup>7</sup>

Os achados laboratoriais se caracterizam, geralmente, por concentração da hemoglobina



bastante variável, desde uma concentração normal até uma anemia intensa, com valores de hemoglobina, muitas vezes, abaixo de 5 g/dL. A presença de reticulocitose pode variar de discreta a moderada; uma macrocitose discreta pode ocorrer em função disso. A evolução para um quadro de anemia microcítica e hipocrômica pode ocorrer devido à perda constante de ferro pela urina.

A presença de leucopenia é um achado que pode ser comum, principalmente pela neutropenia (destruição dos granulócitos pela fixação do complemento), e a atividade da fosfatase alcalina nessas células também pode estar diminuída. A contagem de plaquetas, em geral, está abaixo de 150.000 plaquetas/ $\mu$ L. A medula óssea normalmente mostra hiperplasia eritrocitária, mas, com a evolução da doença, pode se tornar aplásica. Como a hemoglobina nem sempre é evidenciada na urina, o achado urinário mais consistente e importante para o diagnóstico definitivo é a pesquisa da hemossiderina.<sup>7</sup>

A suspeita de HPN deve recair sobre os pacientes que apresentem um quadro de pancitopenia com reticulocitose, sendo os testes de triagem para o diagnóstico da HPN o teste da sacarose e a pesquisa de hemossiderinúria. O teste definitivo é a pesquisa do CD55 e CD59 nos granulócitos e eritrócitos.<sup>7</sup>

Cerca de 70% dos pacientes têm uma sobrevida de 10 anos, e 48% de 15 anos após o diagnóstico.<sup>86</sup> As causas do óbito são os episódios de trombose, as consequências da pancitopenia, e alguns pacientes desenvolvem leucemia aguda.<sup>7</sup>

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Weinberg RA. A biologia do câncer. Porto Alegre: Artmed; 2008.
- Strachman T, Read S. Genética molecular humana. Porto Alegre: Artmed; 2011.
- Braunwald E, Hauser S, Fauci AS, Longo DL, Kasper DL, Jameson JL. Harrison's principles of Internal Medicine. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. Hematology: basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
- Lichtmann MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
- Smith A, Roman E, Howell D, Jones R, Patmore R, Jack A. The Haematological Malignancy Research Network (HMRN): a new information strategy for population based epidemiology and health service research. Br J Haematol. 2009;148(5):739-53.
- Vardman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 2002;100(7):2292-302.
- Vardman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5):937-51.
- Oliveira RAG, Poli Neto A. Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais. São Paulo: Rocca; 2004.
- Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
- Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology principles, procedures, correlations. 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
- Korsmeyer SJ. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. Annu Rev Immunol. 1992;10:785-807.
- Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, Graça CHN, Ferreira E, Hamerschlag N, et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). Rev Bras Hematol Hemoter. 2005;27(2):94-101.
- Chauffaille ML. Diagnóstico citogenético pré-natal [Internet]. São Paulo: Fleury; c2015 [capturado em 2 nov 2013]. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/artigos/Pages/novidades-na-area-de-diagnostico-citogenetico-pre-natal.aspx>.
- UW Medicine Pathology. Cytogenetics gallery [Internet]. Washington: UW Medicine Pathology; c2015 [capturado em 2 nov 2013]. Disponível em: [http://www.pathology.washington.edu/galleries/cytogallery/main.php?file=fish\\_examples](http://www.pathology.washington.edu/galleries/cytogallery/main.php?file=fish_examples).
- Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do leucograma. São Paulo: Robe; 2003.
- Lorenzi TF. Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
- Science Night Club. Resumo de métodos em biologia celular e molecular [Internet]. [S. l.]: Science Nigth Club; 2012 [capturado em 2 nov 2013]. Disponível em: <http://sciencenightclub.blogspot.com.br/2012/04/resumo-de-metodos-em-biologia-celular-e.html>.
- De Zen L, Orfao A, Cazzaniga G, Masiero L, Cocito MG, Spinelli M, et al. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. Leukemia. 2000;14(7):1225-31.
- Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata-Collins JL, et al. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French-American-British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. Am J Clin Pathol. 1999;111:467-76.
- Tabernero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, Lopez-Berges MC, Rasillo A, Garcia-Sanz R, et al. Adult precursor B-ALL with BCRABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34 CD13 and CD38 expression. Leukemia 2001;15:406-14.
- The British Committee for Standards in Haematology. Immunophenotyping in the diagnosis of acute leukaemias. J Clin Pathol. 1994;47(9):777-81.



24. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*. 1995;9(10):1783-6.
25. Cazzola M, Malcovati L, Invernizzi R. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Hematology*. 2011;2011:264-72.
26. Dameshek W. Editorial: some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372-5.
27. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:200-24.
28. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008;93(11):1712-7.
29. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1451-64.
30. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370(9584):342-50.
31. Costa F, Monte-Mór BCR. JAK2 V617F mutation and the myeloproliferative disorders. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(3):241-8.
32. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366(9501):1945-53.
33. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-8.
34. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-90.
35. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2V617F: when to order the test and how to interpret the results. *Leuk Res*. 2006;30(6):739-44.
36. Delhommeau F, Pisani DF, James C, Casadevall N, Constantinescu S, Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(24):2939-53.
37. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;108(7):2435-7.
38. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;107(9):3676-82.
39. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliot M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer*. 2006;106(3):631-5.
40. Hoffbrand AV, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
41. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas G, Glader B. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
42. Beiguelman B. Citogenética humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
43. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu; 2004.
44. Bain BJ. Cytogenetic and molecular genetic aspects of eosinophilic leukemia. *Br J Haematol*. 2003;122(2):173-9.
45. Giral S, Szydlo R, Goldman JM, Veun-Stone J, Biggs JC, Herzig RH, et al. Effect of short-term interferon therapy on the outcome of subsequent HLA-identical sibling bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: an analysis from the international bone marrow transplant registry. *Blood*. 2000;95:410-5.
46. Vardman J, Hyjek E. World Health Organization classification, evaluation and genetics of myeloproliferative neoplasm variants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:250-6.
47. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br Haematol*. 1982;51(2):189-99.
48. Vardman J. Evaluation, classification and genetics in the diagnosis of myeloproliferative neoplasm (MPN) variants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:250-6.
49. Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hamann A, et al. Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2361-70.
50. Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespí T, Luño E, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(3):375-83.
51. Reiter A, Invernizzi R, Cross NC, Cazzola M. Molecular basis of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2009;94(12):1634-8.
52. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(24):6182-92.
53. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-726.
54. Breccia M, Biondo F, Latagliata R, Carmosino I, Mandelli F, Alimena G. Identification of risk factors in atypical chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006;91(11):1566-8.
55. Onida F, Ball G, Kantarjian HM, Smith TL, Glassman A, Albitar M, et al. Characteristics and outcome of patients with Philadelphia chromosome negative, bcr/abl negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 2002;95(8):1673-84.
56. Hoeller S, Walz C, Reiter A, Dirnhofer S, Tzankov A. PCM1-JAK2-fusion: a potential treatment target in myelodysplastic-myeloproliferative and other hemato-lymphoid neoplasms. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(1):53-62.



57. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Galli A, et al. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood*. 2009;114(17):3538-45.
58. Flach J, Dicker F, Shnittger S, Kohlmann A, Haferlach T, Haferlach C. Mutations of JAK2 and TET2, but not CBL are detectable in a high portion of patients with refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis. *Haematologica*. 2010;95(3):518-9.
59. Malcovati L, Cazzola M. Myelodysplastic/myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008;93(1):4-6.
60. Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:169-77.
61. Mrozek K, Marcucci MG, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109(2):431-48.
62. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254-66.
63. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-18.
64. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(5):672-80.
65. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD, et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009;113(9):1906-8.
66. Wandt H, Schäkel U, Kroschinsky F, Prange-Krex G, Mohr B, Thiede C, et al. MLD according to the WHO classification in AML has no correlation with age and no independent prognostic relevance as analyzed in 1766 patients. *Blood*. 2008;111(4):1855-61.
67. Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, et al. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):256-65.
68. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003;102(1):43-52.
69. Andersen MK, Larson RA, Mauritzson N, Schnittger S, Jhanwar SC, Pedersen-Bjergaard J. Balanced chromosome abnormalities inv(16) and t(15;17) in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(4):395-400.
70. Slovak ML, Bedell V, Popplewell L, Arber DA, Schoch C, Slater R. 21q22 balanced Chromosome aberrations in therapy-related hematopoietic disorders: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(4):379-94.
71. Greene ME, Mundschaug G, Wechsler J, McDevitt M, Gammis A, Karp J, et al. Mutations in GATA1 in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;31(3):351-6.
72. Gurbuxani S, Vyas P, Crispino JD. Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*. 2004;103(2):399-406.
73. Massey GV, Zipursky A, Chang MN, Doyle JJ, Nasim S, Taub JW, et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood*. 2006;107(12):4606-13.
74. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
75. Vasconcelos Y. Marcadores de prognóstico na leucemia linfocítica crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27(4):253-6.
76. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
77. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
78. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
79. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberration and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
80. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 Expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363(9403):105-11.
81. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 Expression as a Surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-75.
82. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.



83. Lorenzi TF. Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
84. Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, et al. Lymphoma classification: the gap between biology and clinical management is closing. *Blood*. 1996;88(11):4085-9.
85. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Harrison: princípios de medicina interna. 17a ed. Nova Iorque: McGraw-Hill; 2009.

86. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. Hematologia laboratorial. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.

### **Leitura Recomendada**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Linfonodo [Internet]. Lagoa Nova: UFRN; [20--?] [capturado em 13 jun 2013]. Disponível em: [http://2.bp.blogspot.com/\\_5gAD1odq9Qo/TIBu9GWzAqI/AAAAAAAAADs/Nm8N-VGB7uQ/s1600/Linfonodo+10x04.jpg](http://2.bp.blogspot.com/_5gAD1odq9Qo/TIBu9GWzAqI/AAAAAAAAADs/Nm8N-VGB7uQ/s1600/Linfonodo+10x04.jpg).



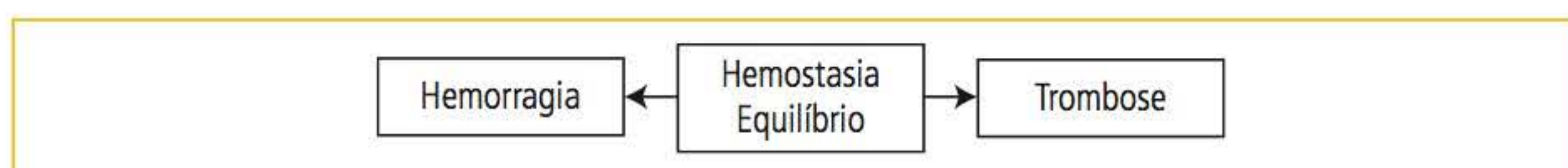
## FASE PÓS-ANALÍTICA

### ASPECTOS GERAIS DA HEMOSTASIA E HEMOSTASIA PRIMÁRIA

# 12

#### ASPECTOS GERAIS DA HEMOSTASIA

A hemostasia pode ser definida como o equilíbrio entre a hemorragia e a trombose, ou seja, o sangue deve correr no sistema circulatório de maneira fluida. Não pode extravasar e nem coagular: a primeira situação caracteriza um quadro de hemorragia, e a segunda, de trombose. Caso ocorra uma das duas situações, o organismo humano deve ter mecanismos que inibam o extravasamento sanguíneo ou a formação de trombos. Além disso, as células epiteliais que fazem o revestimento interno dos vasos sanguíneos, túnica íntima, não devem apresentar lesões e nem estar ativadas. O próprio vaso sanguíneo deve se mostrar íntegro e com elasticidade. Quando todo esse conjunto funciona de modo harmônico, ativando-se e desativando-se quando necessário, a hemostasia está mantida. Quando qualquer um desses componentes está alterado, a balança da hemostasia, que representa o equilíbrio, ou pende para a trombose ou para a hemorragia.<sup>1</sup> A **Figura 12.1** faz a representação da hemostasia e de seus dois extremos, a hemorragia e a trombose.



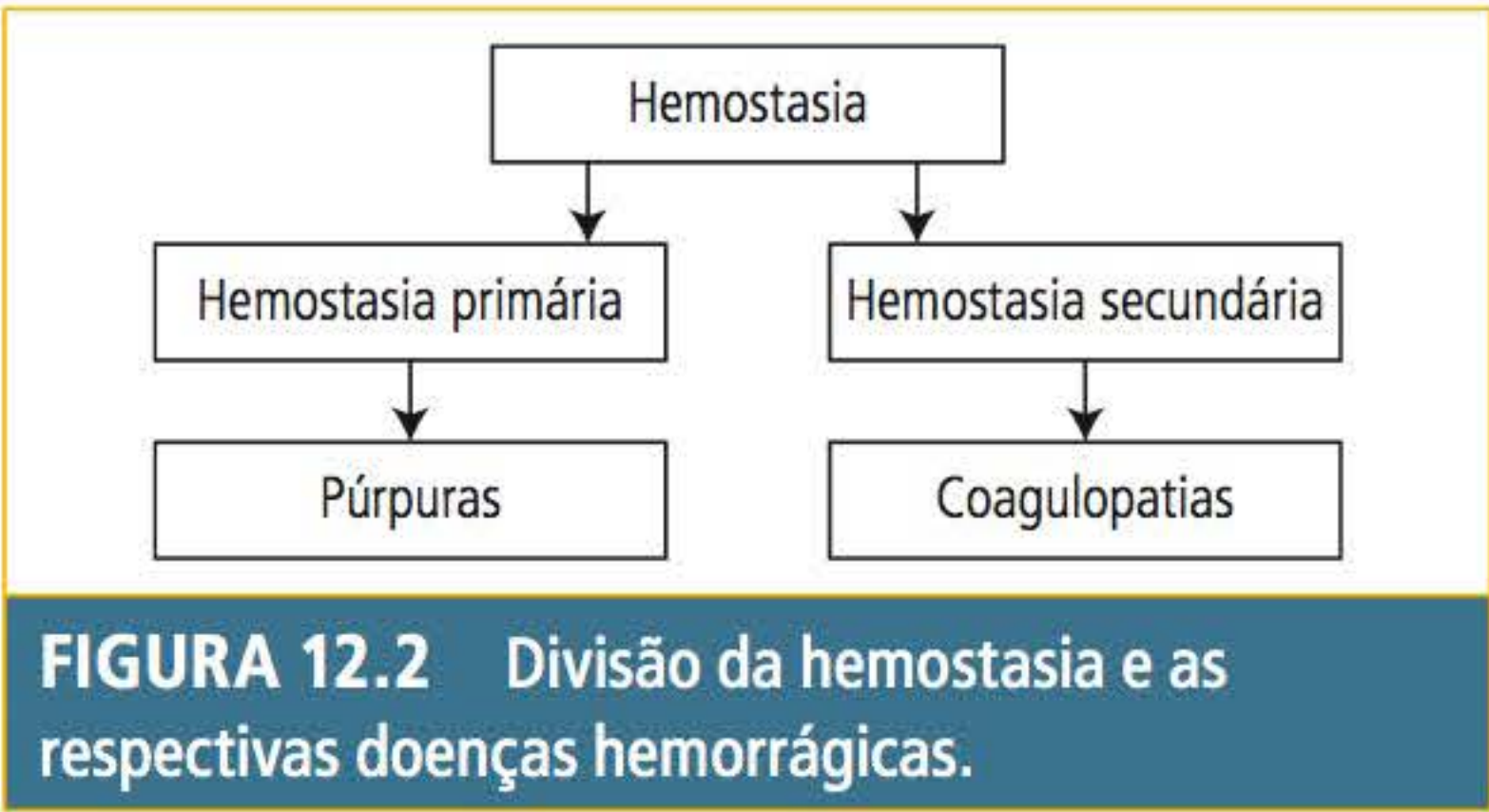
**FIGURA 12.1** Representação do equilíbrio hemostático.

Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

Concorrem para o equilíbrio hemostático as células endoteliais (que revestem a luz dos vasos sanguíneos), as plaquetas, os fatores plasmáticos da coagulação, os inibidores fisiológicos da coagulação, o sistema fibrinolítico e os mecanismos antifibrinolíticos.<sup>1</sup>

A hemostasia também pode ser dividida, de modo didático, em hemostasia primária e hemostasia secundária. A hemostasia primária ocorre na microcirculação e tem a participação dos vasos sanguíneos, das plaquetas e das células endoteliais.<sup>1</sup> As alterações na hemostasia primária caracterizam as doenças hemorrágicas chamadas de púrpuras.<sup>1</sup> A hemostasia secundária ocorre nos vasos de grande calibre, e os fatores que dela participam são as plaquetas, as células endoteliais, os fatores da coagulação, os inibidores fisiológicos da coagulação, o sistema fibrinolítico e os mecanismos antifibrinolíticos.<sup>1</sup> As alterações na hemostasia secundária caracterizam as doenças hemorrágicas chamadas de coagulopatias.<sup>1</sup> O termo coagulação sanguínea, muitas vezes usado de modo abrangente, como se representasse a hemostasia, refere-se apenas aos fatores plasmáticos da coagulação.<sup>2</sup> A **Figura 12.2** representa a divisão da hemostasia em primária e secundária e as respectivas doenças hemorrágicas.

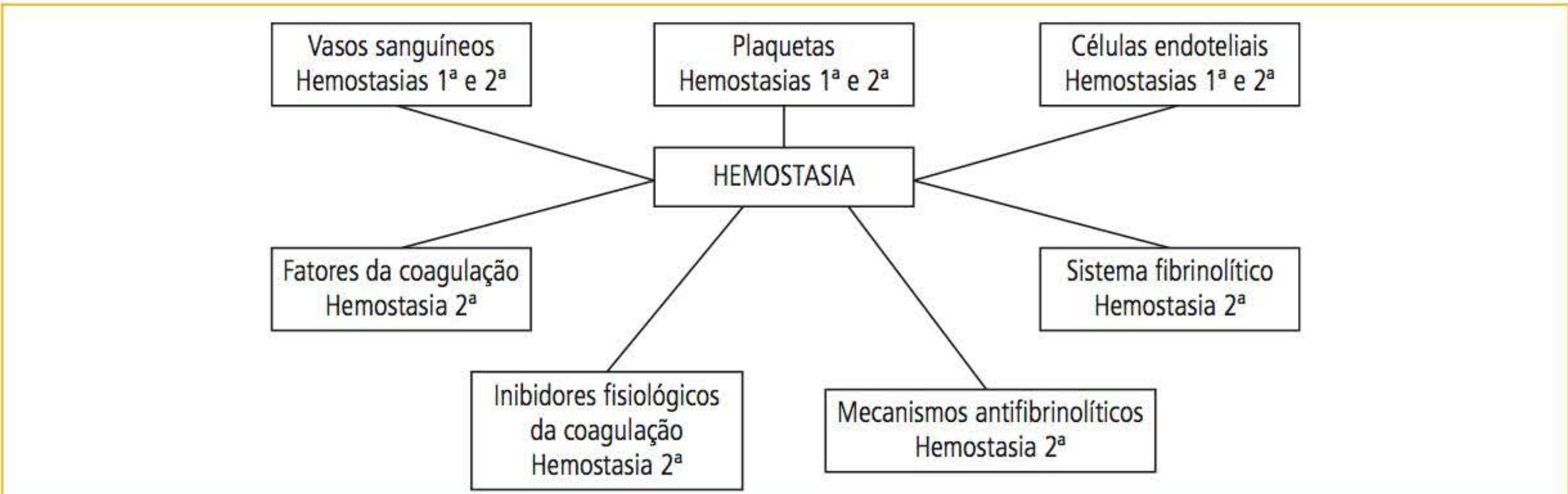




**FIGURA 12.2** Divisão da hemostasia e as respectivas doenças hemorrágicas.

A **Figura 12.3** representa a hemostasia e todos os fatores que para ela concorrem, definindo-os entre hemostasia primária e secundária. Quando se tem uma deficiência na hemostasia primária, por exemplo, uma deficiência plaquetária,

numérica ou funcional, estabelece-se a doença hemorrágica chamada de púrpura, a qual tem como sangramento característico as petéquias (sangramento puntiforme de coloração vermelho vivo), as equimoses (manchas com cerca de 1 cm de diâmetro que adquirem uma coloração arroxeada), gengivorragias (sangramento gengival), epistaxe (sangramento nasal), sangramentos gastrintestinais e em sistema nervoso central. A **Figura 12.4** mostra fotos de petéquias e equimoses. Quando se tem uma deficiência na hemostasia secundária, ou seja, uma deficiência em algum dos fatores da cascata da coagulação, estabelece-se a doença hemorrágica chamada de coagulopatia, a qual tem como sangramentos característicos os



**FIGURA 12.3** Fatores que concorrem para o equilíbrio hemostático.

Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>



**FIGURA 12.4** (A e B) Petéquias. (C) Equimoses.

Fonte: Hoffbrand e colaboradores.<sup>3</sup>



hematomas e as hemartroses (sangramento no interior das articulações). A **Figura 12.5** mostra fotos de hematomas e hemartroses.

### HEMOSTASIA PRIMÁRIA

Neste tópico, serão abordadas as funções dos vasos sanguíneos e das plaquetas.

#### ❖ VASO SANGUÍNEO

##### Estrutura do vaso sanguíneo

Os vasos sanguíneos que compõem a macrocirculação são formados por três camadas: as túnicas íntima, média e adventícia.<sup>4</sup> A túnica íntima é formada pelas células endoteliais, as quais revestem a luz dos vasos sanguíneos, e pelo subendotélio, onde está localizada a membrana basal, que é uma base de suporte para as células endoteliais e representa uma barreira secundária ao extravasamento sanguíneo.<sup>5</sup> A matriz extracelular (MEC) da túnica íntima é composta por células musculares lisas, por macrófagos e por uma camada de elastina que a separa da túnica média.<sup>5</sup> A túnica média é composta por camadas concêntricas de fibras musculares lisas e de MEC (glicoproteínas e proteoglicanos).<sup>5</sup> Essa camada é responsável pela manutenção da integridade estrutural

do vaso e do tônus vascular.<sup>5</sup> A túnica adventícia é composta por tecido conectivo (especificamente fibroblastos),<sup>2</sup> pequena inervação e vasos sanguíneos que têm a finalidade de nutrir essa região.<sup>5</sup>

A microcirculação é representada por capilares, arteríolas e vênulas compostos de células endoteliais e do subendotélio (membrana basal e MEC).

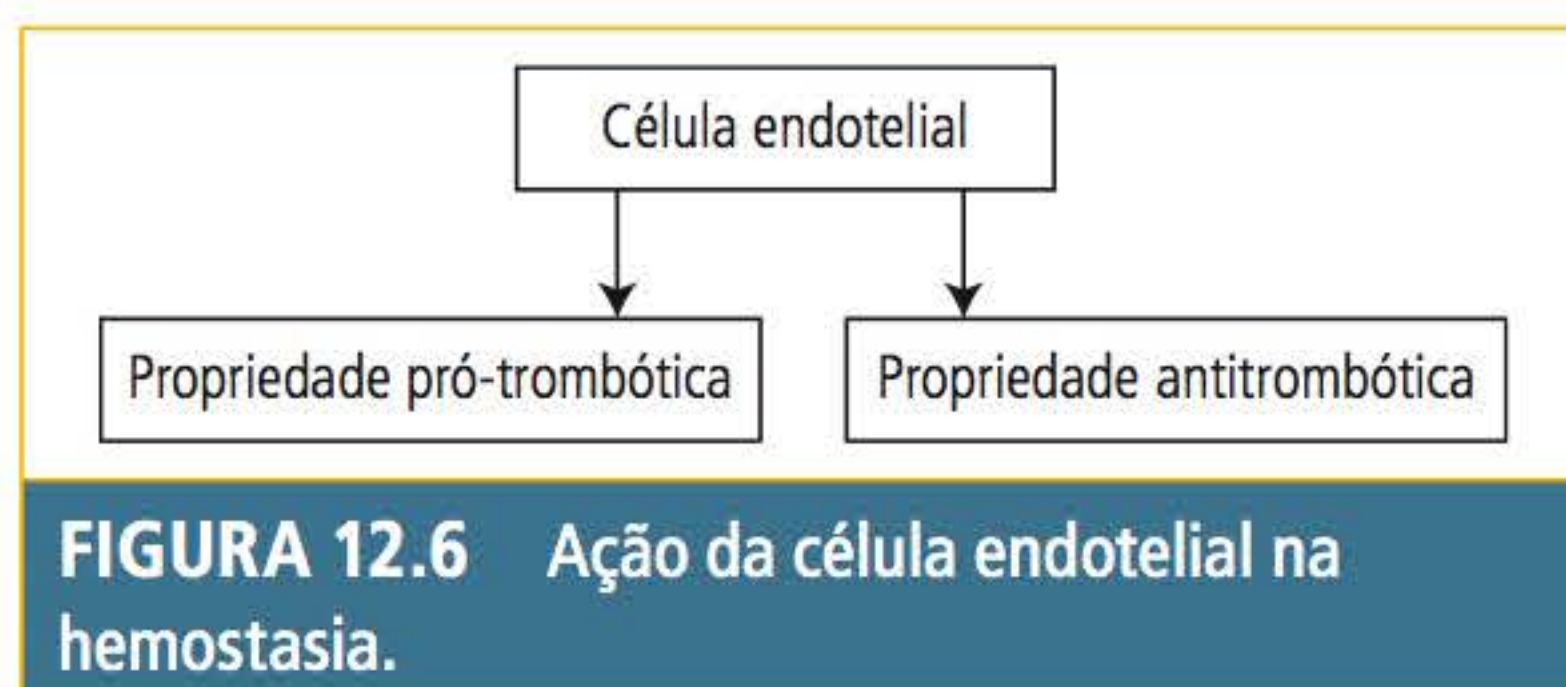
A célula endotelial desempenha um papel extremamente importante na hemostasia porque ativa a hemostasia primária, a secundária e o sistema fibrinolítico e participa da resposta inflamatória ativando leucócitos (neutrófilos, monócitos e outras células) e liberando citocinas. Esse papel da célula endotelial é chamado de tromborregulação e determina dois fenótipos para a célula endotelial: fenótipo anticoagulante e coagulante. Quando o endotélio está normal, o fenótipo da célula endotelial é anticoagulante com consequente inibição da agregação das plaquetas circulantes, prevenção da ativação e propagação da cascata da coagulação e ativação do sistema fibrinolítico.<sup>5</sup> Quando ocorre qualquer lesão vascular, lesão da célula endotelial ou liberação de produtos inflamatórios, o fenótipo da célula endotelial passa a ser pró-coagulante.<sup>5</sup> A **Figura 12.6** representa a ação da célula endotelial na hemostasia.



**FIGURA 12.5** (A e B) Hemartroses. (C) Hematoma.

Fonte: Hoffbrand e colaboradores.<sup>3</sup>





Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

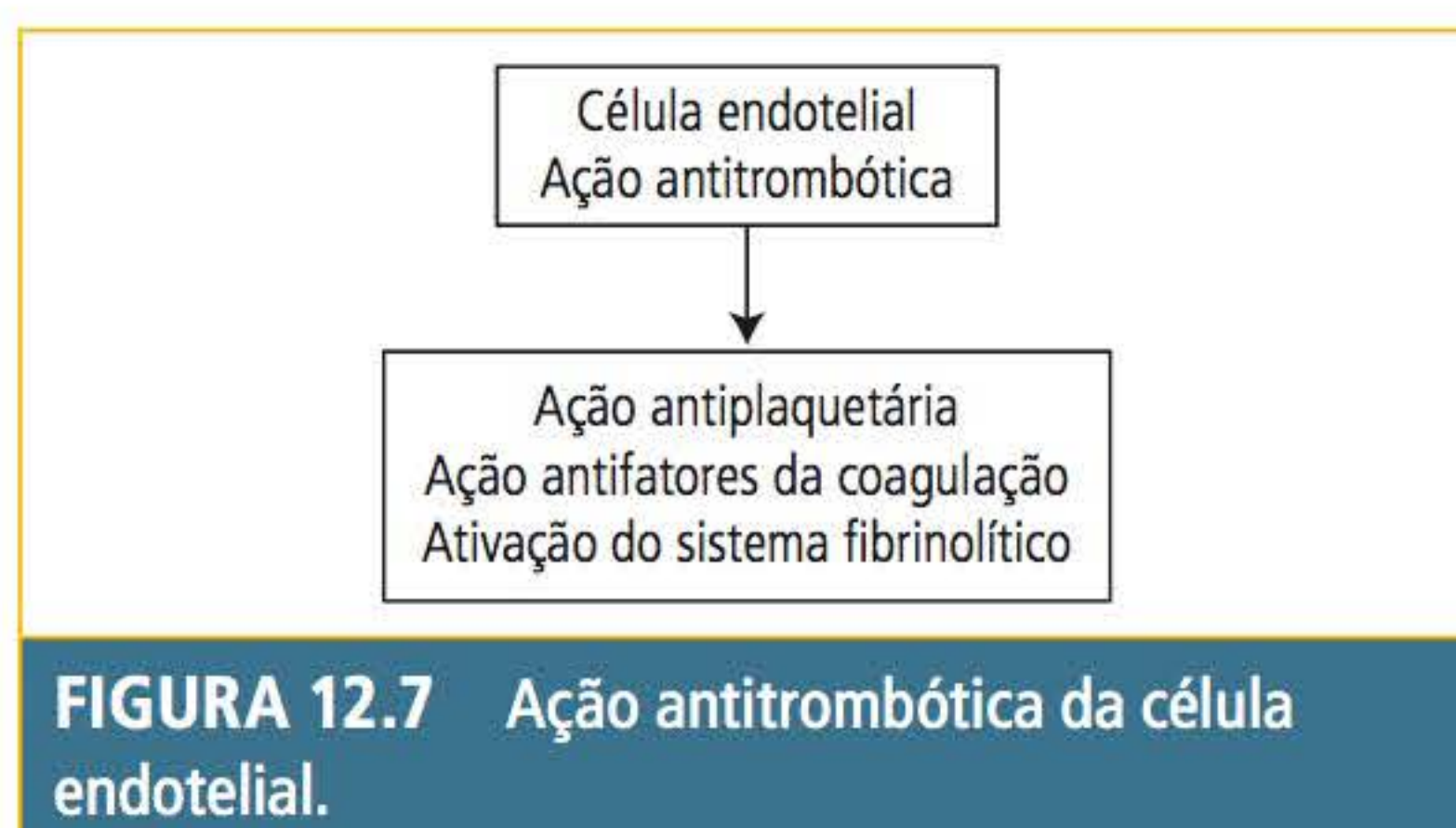
Outro papel importante da célula endotelial é limitar o fenótipo pró-coagulante ao sítio inflamatório ou ao local de lesão ou dano celular. Isso impede que o fenótipo pró-coagulante se dissemine pelo sistema circulatório.

### Tromborregulação

Tromborregulação (ou sistema tromborregulatório) é a interação que ocorre entre o endotélio vascular e o sangue circulante com a finalidade de inibir ou facilitar a formação de um trombo.<sup>6</sup> Essa interação é representada pelo equilíbrio das expressões das propriedades antitrombóticas e pró-trombóticas da célula endotelial.

As propriedades antitrombóticas são expressas com a finalidade de prevenir ou reverter a agregação plaquetária e inibir os fatores da coagulação e a formação de fibrina e, com isso, manter a fluidez do sangue. Em situação fisiológica, o vaso sanguíneo está expressando as propriedades antitrombóticas. Quando ocorrem alterações de fluxo sanguíneo, lesão vascular e aumento da turbulência e na vigência de um processo inflamatório, as células endoteliais passam a expressar um fenótipo pró-trombótico e antifibrinolítico.

A atividade antitrombótica da célula endotelial pode ser dividida em três ações: antiplaquetária, antifatores da coagulação e antissistema fibrinolítico. A **Figura 12.7** representa a ação antitrombótica da célula endotelial.



Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

A ação antiplaquetária é representada pelo fato de que plaquetas não ativadas não se aderem ao endotélio. A célula endotelial secreta agentes inibidores da ação plaquetária, como óxido nítrico, prostaglandina ( $\text{PGI}_2$ ) e ADPases.<sup>5</sup>

O óxido nítrico ( $\text{NO}^+$ ) é um gás incolor, solúvel em água, altamente reativo com o oxigênio e com o qual forma o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) e também um cátion estável, o  $\text{NO}^+$ , o qual induz a vasodilatação (porque atua sobre as células musculares lisas),<sup>5</sup> regula o tônus muscular normal e inibe a adesão, a ativação e a agregação plaquetária.<sup>2,5</sup>

Quando a plaqueta sofre algum estímulo e se torna ativada, mas o fenótipo antifibrinolítico deve ser mantido, a célula endotelial secreta a  $\text{PGI}_2$ . A secreção ocorre porque a concentração de cálcio intracelular aumenta dentro da célula endotelial, e esse aumento resulta em ativação da fosfolipase  $\text{A}_2$ , a qual catalisa a formação do ácido aracdônico a partir de fosfolípidos da membrana.<sup>2</sup> O ácido aracdônico, por ação da cicloxigenase, forma um endoperóxido cíclico, o  $\text{PGG}_2$ , que é reduzido por uma peroxidase a outro endoperóxido, o  $\text{PGH}_2$ .<sup>2</sup> A  $\text{PGI}$  sintetase catalisa a formação da prostaciclina  $\text{PGI}_2$  a partir do  $\text{PGH}_2$ . A secreção de  $\text{PGI}_2$ , pela célula endotelial, aumenta o nível intracelular plaquetário de adenosina monofosfato (AMP) cíclico, levando à inibição da secreção plaquetária e inibição da mudança de forma da plaqueta e não permitindo a ligação do fibrinogênio e do fator von Willebrand à plaqueta, por bloquear os seus receptores.<sup>2</sup> Inibe, também, a adesão da plaqueta ao endotélio. Além de inibidor da agregação plaquetária, o  $\text{PGI}_2$  é um potente vasodilatador.<sup>2</sup> Níveis elevados de LDL predispoem à formação de trombos por inibirem a produção de  $\text{PGI}_2$ .<sup>2</sup>

A adenosina difosfato (ADP) é um potente agente agregante; a célula endotelial, a partir das ectoenzimas (ADPases), transforma a ADP em AMP e adenosina; a última é um inibidor potente da função plaquetária.<sup>2</sup>

A ação de inibição dos fatores da coagulação é representada pela secreção de glicosaminoglicans (GAG) como o heparan e o dermatan sulfatos, que têm atividade de heparina e catalisam a inativação da trombina, do fator IX ativado e do fator X ativado pela antitrombina e pela heparina cofator II.<sup>2,5</sup> Outra maneira de inativar os fatores de coagulação é a secreção de trombomodulina (TM) e da proteína S (PS) pela célula endotelial, quando



ocorre geração de trombina.<sup>2</sup> O complexo trombi-na-TM ativa a proteína C (PC), que se complexa com a PS, inativando os fatores V e VIII ativados.<sup>2,5</sup> O inibidor da via do fator tissular também é secre-tado pelas células endoteliais e inibe o fator tissular que, quando complexado com o fator VII, inibe também o complexo fator tissular – fator VIIa-Xa.<sup>7</sup> O sistema fibrinolítico pode ser ativado pelo en-dotélio pela síntese e secreção do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) e da uroquinase (u-TP). Esses dois produtos transformam o plasminogê-nio em plasmina, que atua sobre a fibrina forma-da, gerando os produtos de degradação da fibrina (PDF), com ação antiplaqueta e antitrombina.<sup>2</sup> A ativação do plasminogênio é regulada pela pró-pria célula endotelial e pelas plaquetas por meio dos inibidores dos ativadores do plasminogênio (PAI).<sup>2</sup>

Quando a célula endotelial sofre algum estí-mulo, como lesão vascular, alteração do fluxo san-guíneo, placas de ateroma, presença de toxinas bacterianas e imunocomplexos, e na presença de produtos inflamatórios, ela muda o fenótipo de anticoagulante para pró-coagulante.<sup>2,5</sup> Quando o fenótipo pró-coagulante se manifesta, a célula en-dotelial secreta o fator tissular, que é específico na ativação do fator VII e desencadeia a cascata da coagulação via fator VII ativado.<sup>2</sup> A célula endote-lial também secreta um ativador da protrombina, que é capaz de gerar trombina diretamente da protrombina.<sup>2</sup> A célula endotelial também secreta inibidores dos ativadores do plasminogênio.<sup>2</sup> A partir desse ponto, a formação de fibrina só será interrompida por ação dos inibidores fisiológicos da coagulação e com a mudança para o fenótipo antitrombótico.<sup>2</sup> Se as propriedades pró-trombó-ticas forem mantidas, por persistência de algum estímulo, a fibrina continuará a ser gerada.<sup>2</sup> A cé-lula endotelial ativada também secreta o fator de von Willebrand (o qual está localizado nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais), que promove a adesão plaquetária, com consequente ativação e agregação plaquetária; desse modo, está desencadeada a hemostasia primária.<sup>2</sup> Na presen-ça de produtos inflamatórios, como o fator de ne-crose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis fac-tor*) e a interleucina-1 (IL-1), a célula endotelial secreta o fator tissular, o fator de von Willebrand, o fator ativador de plaquetas e a fibronectina, que potencializam a formação de trombos.<sup>5</sup> O vaso sanguíneo, além da tromborregulação, tem uma

resposta imediata após a lesão vascular, que é a va-soconstrição. É uma ação transitória que tem a fi-nalidade de reduzir o fluxo sanguíneo no local lesado; essa ação tem eficácia na microcirculação.<sup>2</sup>

A formação de um trombo resultante da gera-ção de fibrina e da atividade plaquetária não ocorre somente quando a pessoa sofre um traumatismo vascular (p. ex., um corte com consequente extra-vasamento sanguíneo). Existem situações que rompem o equilíbrio entre as ações anti e pró-co-agulantes da célula endotelial. Entre elas, os estados de hipercoagulabilidade primários e secundários, hipercolesterolemia (com aumento de LDL-coles-terol) e as doenças inflamatórias e infecciosas, tanto agudas como crônicas.

**Aterosclerose**

A aterosclerose pode ser considerada como um processo inflamatório crônico causado pela intera-ção entre lipoproteínas, macrófagos, linfócitos T, plaquetas e células endoteliais.<sup>2</sup> Esse processo in-flamatório dá origem às placas de ateroma que podem obstruir a luz do vaso sanguíneo, podendo romper-se e desencadear a formação de um trombo arterial.<sup>5</sup> As lesões ateroscleróticas ocorrem em artérias de médio e grande calibre.<sup>5</sup> O risco para o desenvolvimento da aterosclerose está baseado em componentes genéticos e ambientais. O **Quadro 12.1** descreve os componentes genéticos e am-bientais que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose.<sup>8</sup>

**QUADRO 12.1** Componentes genéticos e ambientais que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose

COMPONENTES GENÉTICOS	COMPONENTES AMBIENTAIS
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Níveis elevados de LDL e VLDL</li><li>▪ Baixos níveis de HDL</li><li>▪ Lipoproteína A elevada</li><li>▪ Hipertensão</li><li>▪ Diabetes melito</li><li>▪ Sexo masculino</li><li>▪ Níveis elevados de homocisteína</li><li>▪ Obesidade</li><li>▪ História familiar</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Tabagismo</li><li>▪ Vida sedentária</li><li>▪ Nível elevado de colesterol</li><li>▪ Dieta rica em gorduras</li><li>▪ Agentes infecciosos</li></ul>

Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

Uma das hipóteses formuladas na formação da placa de ateroma é o aumento da taxa do



LDL-colesterol, que é considerado como o único fator que de forma isolada pode levar ao desenvolvimento da aterosclerose.<sup>8</sup> A placa de ateroma inicia com a deposição e acúmulo de LDL-colesterol sobre macrófagos e células musculares lisas quando o LDL penetra a parede da artéria.<sup>5</sup> O LDL-colesterol é oxidado, o que causa um dano à célula endotelial. A célula endotelial alterada passa a expressar moléculas de adesão celular (selectinas e integrinas) recrutando monócitos sanguíneos, os quais passam entre a junção das células endoteliais, rompem a membrana basal e se localizam na matriz extracelular da túnica íntima, local onde se diferenciam em macrófagos.<sup>5,8</sup> Os produtos de oxidação do LDL-colesterol são englobados pelo macrófago.<sup>8</sup> Nesse ponto, estabelece-se um sítio inflamatório porque a deposição de LDL-colesterol continua em razão da taxa elevada de colesterol, a célula endotelial lesada continua a recrutar mais monócitos, os quais vão se diferenciar em macrófagos e continuam endocitando os produtos da oxidação do LDL-colesterol.<sup>8</sup> A oxidação do LDL-colesterol faz com que a molécula não seja mais reconhecida pelos receptores celulares de LDL-colesterol, mas sim por receptores dos macrófagos,<sup>8</sup> chamados de *scavenger receptors*.<sup>5</sup> Inicialmente, o recrutamento de monócitos (os quais vão se diferenciar em macrófagos) é protetor porque retira o LDL-oxidado, o qual é citotóxico e pró-inflamatório, mas o acúmulo de macrófagos devido à contínua oxidação do LDL leva ao desenvolvimento da placa de ateroma.<sup>8</sup> É interessante notar que quem seleciona a célula que deve migrar ao sítio inflamatório é a célula endotelial, e ela o faz dependendo do tipo de selectina e integrina que ela expressar. Os linfócitos T também são recrutados ao sítio inflamatório enquanto os neutrófilos estão ausentes.<sup>8</sup> Os macrófagos endocitam o LDL-oxidado acumulando em seu citoplasma uma grande quantidade de colesterol livre e de ésteres de colesterol e formam um tipo característico de macrófago. Pelo fato de o colesterol livre e os ésteres de colesterol serem estocados na forma de gotas de lipídeos, esses macrófagos são chamados de *foam cells*.<sup>8</sup> A lesão, agora, torna-se mais complexa porque as células musculares lisas da túnica média migram para a íntima, proliferam, aumentam a endocitose de lipídeos pelos macrófagos e passam a sintetizar

proteínas da matriz extracelular, o que leva ao desenvolvimento de uma cápsula fibrosa.<sup>8</sup> A migração das células musculares ocorre por estímulo de citocinas produzidas pela célula endotelial.<sup>8</sup> Nesse ponto, ocorre a interação de linfócitos T com os macrófagos, resultando em uma resposta celular e humoral, caracterizando-se o processo inflamatório crônico.<sup>8</sup> Os linfócitos que migram ao sítio inflamatório são as populações Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, que expressam uma série de citocinas, entre elas: interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-2, 3, 4, 5, 6, 10 e 13) e fator estimulante de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Essas citocinas aumentam a migração de macrófagos ao sítio inflamatório e também a oxidação do LDL-colesterol.<sup>8</sup> Os linfócitos T estimulam a produção de autoanticorpos antilipídeos oxidativamente modificados e antiproteínas pelos linfócitos B.<sup>8</sup> A ativação do sistema imunológico inicia o progresso da placa aterogênica.<sup>8</sup> A consequência do aumento da placa de ateroma é a diminuição da luz do vaso sanguíneo, podendo levar, a partir de uma oclusão total, à isquemia.<sup>8</sup> Outra consequência é que essa placa pode romper-se e expor fosfolipídeos ao sangue circulante (fator tissular). A partir dessa exposição, o fator VII é ativado e desencadeia-se a cascata da coagulação com a formação de fibrina.<sup>8</sup> Níveis elevados de fator tissular são encontrados nas placas de ateroma, principalmente nas lesões mais avançadas. Ao mesmo tempo, por exposição do subendotélio, as plaquetas tornam-se ativadas, aderindo-se e agregando-se. A consequência desses dois eventos (ativação da hemostasia primária e secundária) é a trombose arterial,<sup>8</sup> que é iniciada pela ruptura da placa de ateroma com exposição de material trombogênico do subendotélio ao sangue.<sup>5</sup> O trombo formado pode ser não oclusivo e incorporar-se à placa de ateroma, mas na medida em que a artéria tem seu calibre diminuído e com a contínua adesão e agregação plaquetária e pela deposição de fibrina, ocorre a formação de um trombo oclusivo.<sup>5</sup> A aterosclerose pode ser considerada uma doença sistêmica que envolve todas as artérias e tem um crescimento muito lento ao longo de vários anos.<sup>5</sup> Na placa de ateroma, é a célula endotelial que desencadeia o processo inflamatório ao se tornar ativada, sendo a causa dessa ativação o aumento e a oxidação do LDL-colesterol. Célula en-



dotelial ativada significa mudança de fenótipo antitrombótico para pró-trombótico, produção de citocinas, expressão de moléculas de adesão celular e perda da integridade vascular. Cerca de dois terços das síndromes coronarianas agudas ocorrem a partir de placas ateroscleróticas.<sup>8</sup>

## ■ PLAQUETAS

### Trombocitopoiese

As plaquetas são estruturas derivadas do citoplasma do megacariócito; não são consideradas células porque não têm núcleo e são incapazes de realizar divisão celular. Circulam entre 8 e 10 dias, sendo posteriormente retiradas da circulação pelo baço; a renovação plaquetária está em torno de 35.000 plaquetas/ $\mu$ L/dia.<sup>2</sup> São responsáveis pela hemostasia primária (funções de adesão e agregação), participam da hemostasia secundária (correlacionam-se com os fatores da coagulação), estão envolvidas nos mecanismos de trombose e são causa de patologias por diminuição no número de plaquetas (trombocitopenias), por aumento do número (trombocitoses) e por alteração da função. Em condições fisiológicas, as plaquetas circulantes não estão ativadas. O número de plaquetas varia entre 150 a 450.000 plaquetas/ $\mu$ L e permanece constante, para cada indivíduo, em situações fisiológicas.

A produção de plaquetas inicia no saco vitelínico, posteriormente passa ao tecido hepático na vida fetal e, próximo ao nascimento, a produção plaquetária é feita na medula óssea.<sup>2</sup>

A partir da célula-tronco comprometida com a linhagem mieloide, forma-se uma célula chamada de unidade formadora de eritrócitos e megacariócitos, que, morfológicamente, assemelha-se a um linfócito pequeno.<sup>2</sup> Está bem estabelecido que a eritropoiese e a megacariopoese têm um progenitor celular em comum. A próxima célula na sequência para a formação das plaquetas é a BFU-Meg (*burst-forming unit megacaryocyte*). *Burst* significa explosão, e é a célula que sustenta a quantidade de plaquetas circulantes. Posteriormente, é formada a célula chamada de unidade formadora de megacariócitos (CFU-MK). A próxima célula é o megacariócito estágio I ou megacarioblasto, correspondendo a 20% das células megacariocíticas da medula óssea normal. Apresenta um núcleo único de forma variada entre arredondada, ovalada ou riniforme, cromatina

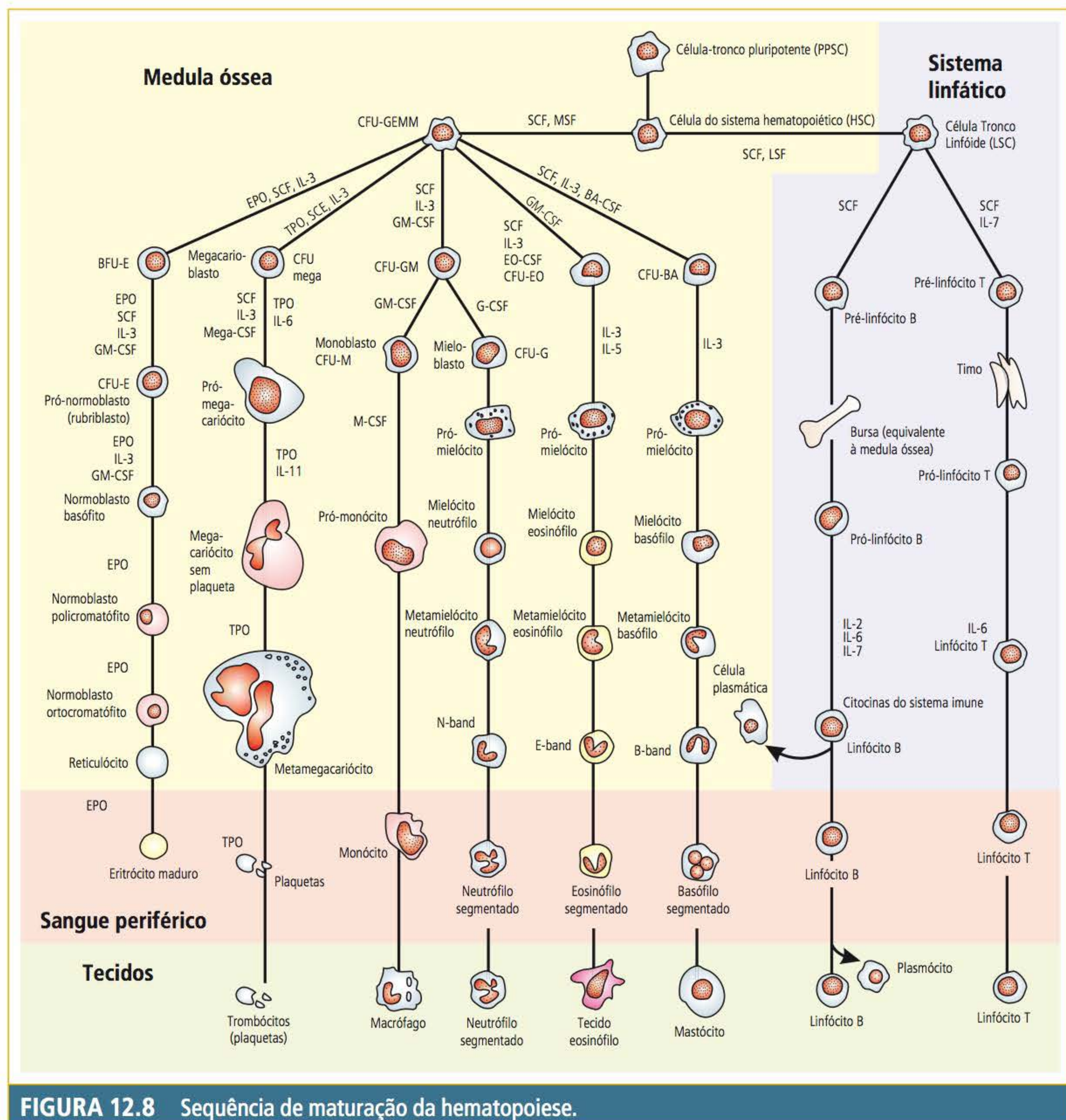
homogênea, com o número de nucléolos variando entre 1 a 5, citoplasma geralmente agranular e basofílico.<sup>2</sup>

O megacariócito estágio II compõe cerca de 25% das células megacariocíticas da medula óssea normal, apresenta núcleo lobulado, basofilia discreta de citoplasma com quantidade abundante de grânulos alfa e organelas e relação núcleo/citoplasma bastante diminuída.<sup>2</sup> Os megacariócitos de estágio III e IV são células extremamente grandes, com relação núcleo/citoplasma muito diminuída.<sup>2</sup> A **Figura 12.8** mostra a sequência de maturação da hematopoiese com destaque para a trombocitopoiese.

A trombocitopoiese caracteriza-se por ter uma divisão celular completamente diferente das demais células, e a principal diferença e característica é a endomitose, um processo pelo qual o núcleo se divide sem que haja separação do citoplasma, originando células grandes, multinucleadas e poliploides.<sup>2</sup> Na endomitose, a célula entra em mitose passando pelas fases de prófase, pró-metáfase e metáfase, mas não entra em anáfase e telófase; portanto, não ocorre a citocinese. A característica da endomitose é a ploidia celular: à medida que a célula matura, o número cromossômico aumenta (4n, 16n, 32n, 64n).<sup>5</sup> Ao mesmo tempo em que a ploidia celular aumenta (maturação da célula), ocorre aumento do citoplasma, que está correlacionado com a formação de plaquetas. Inicialmente, foi descrito que a formação e liberação de plaquetas ocorriam pelo sistema de demarcação de membranas,<sup>9</sup> uma rede de microtúbulos que se origina da membrana citoplasmática em direção ao núcleo. Esse sistema vai demarcando as áreas que serão as plaquetas e posteriormente essas áreas são liberadas do megacariócito como plaquetas funcionais. Atualmente, o mecanismo aceito de formação de plaquetas inicia com a formação de pró-plaquetas.<sup>5</sup> O citoplasma do megacariócito emite pseudópodos; no início, esses pseudópodos são largos, mas, na medida em que eles progridem em extensão, tornam-se finos e, no final dos pseudópodos, são formadas estruturas arredondadas (discoides) que são as futuras plaquetas.<sup>5</sup> O corpo celular residual do megacariócito entra em apoptose.<sup>5</sup>

As plaquetas são formadas a partir de pró-plaquetas originadas nos estágios III e IV. É estimado que cada megacariócito origine entre 1.000 a 5.000 plaquetas.<sup>5</sup>





**Fonte:** Adaptada de Silva e Hashimoto.<sup>10</sup>

## Trombopoietina (TPO)

Além da trombopoietina, várias citocinas são descritas como tendo efeito sobre a trombocitopoiese, entre elas, interleucina-3 (IL-3), fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), *c-kit* ligante, interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11) e fator inibidor de leucemias (LIF).<sup>2,5</sup> Nenhum dos fatores citados tem um efeito significativo sobre a produção plaquetária; mesmo quando ausentes, não alteram significativamente a trombocitopoiese.<sup>2</sup> O termo trombopoietina foi utilizado pela primeira vez em 1958 para designar o hormônio que regula a produção de plaquetas<sup>11</sup> e foi

clonada pela primeira vez em 1994.<sup>5</sup> A TPO apresenta uma homologia muito grande com a eritropoietina e, atualmente, está bem estabelecido que é a proteína que regula a trombocitopoiese;<sup>2</sup> ela sinergiza com a eritropoietina para expandir os progenitores eritroides e a produção de eritrócitos.<sup>5</sup>

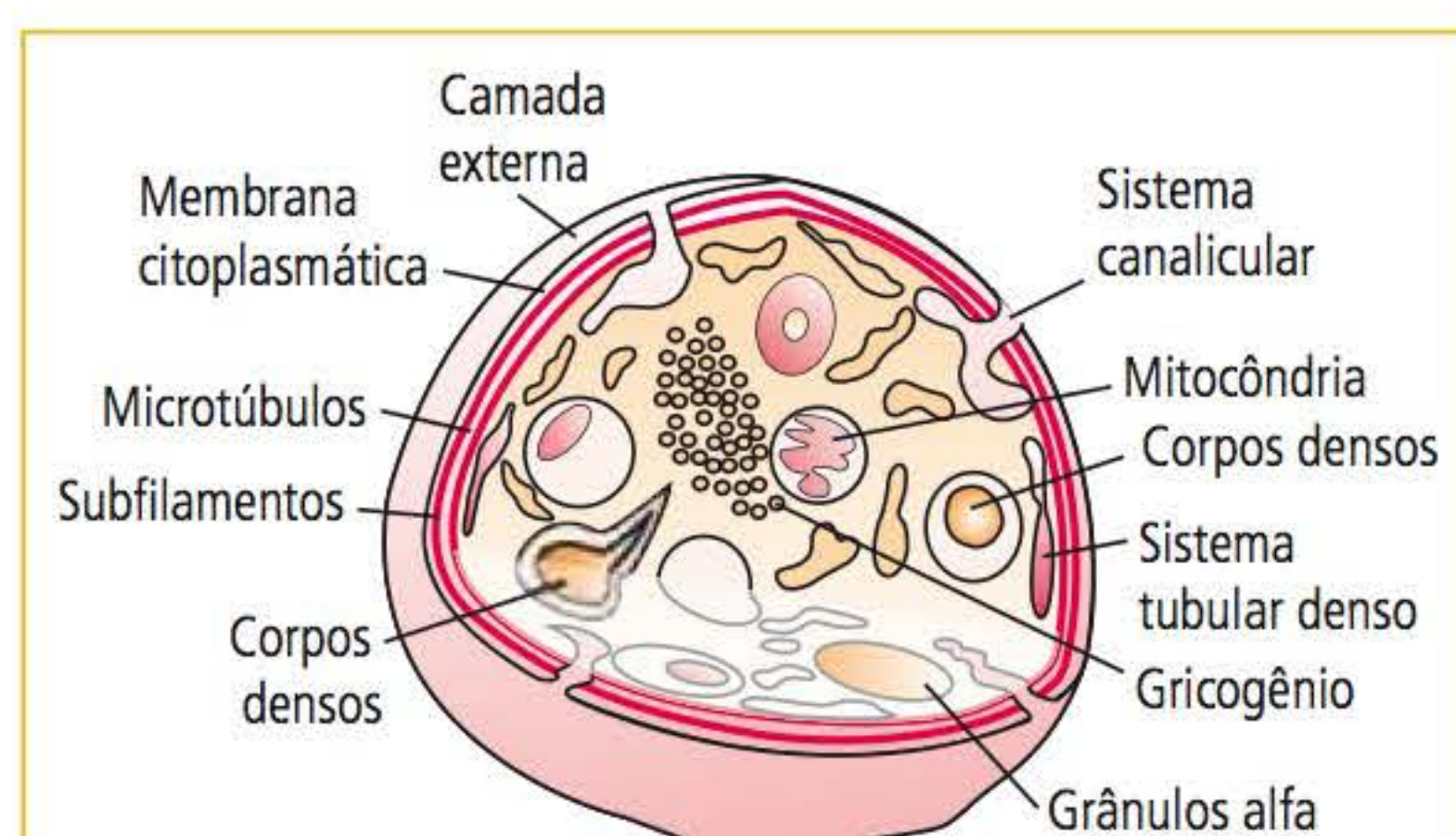
A TPO é uma glicoproteína com 80 a 90 kDa sintetizada pelos hepatócitos no cromossomo 3 (3q26-28),<sup>2</sup> pela medula óssea, pelo rim e pelo baço.<sup>5</sup> A produção hepática da TPO é constitutiva, e o nível plasmático é determinado pela quantidade de plaquetas circulantes.<sup>2</sup> A TPO regula todos os estágios de desenvolvimento do megacariócito,



e a quantidade de plaquetas circulantes é constante e pode aumentar quando for necessário porque a TPO aumenta o número e o tamanho dos megacariócitos.<sup>5</sup>

### Estrutura plaquetária

A plaqueta pode ser dividida em várias partes para o estudo de sua estrutura: membrana citoplasmática, citoesqueleto, organelas e sistemas de membrana. A **Figura 12.9** apresenta um esquema da estrutura plaquetária.



**FIGURA 12.9** Esquema da estrutura plaquetária.

Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

### Membrana citoplasmática

A membrana citoplasmática da plaqueta apresenta glicoproteínas com uma ou mais cadeias ramificadas de polissacarídeos que formam uma camada externa chamada de glicocálix, carregada negativamente.<sup>2</sup> Logo abaixo da camada externa, está a membrana citoplasmática, constituída de uma camada trilaminar com dupla camada fosfolipídica enriquecida de colesterol, glicolipídeos e glicoproteína. Os fosfolipídeos são ricos em ácido aracdônico (que é o precursor da síntese de ácidos hidroxieicosatetraenoicos) e estão relacionados com o mecanismo de ativação plaquetária.<sup>2</sup> As proteínas de membrana são receptores citoplasmáticos que fazem a interação da plaqueta com o meio externo.<sup>2</sup>

A nomenclatura mais utilizada para os receptores plaquetários está baseada na mobilidade eletroforética das proteínas da membrana em gel de poliácridamida.<sup>5</sup> As glicoproteínas (GP) foram nomeadas como GPI (peso molecular mais alto), GPII, GPIII e assim por diante.<sup>5</sup> Os receptores plaquetários também podem estar dispostos, de modo não covalente, como complexos GPIb/IX/V, GPIc/2a e GPIIb/IIIa; esses complexos são considerados como um único receptor.<sup>5</sup> As integrinas

são proteínas transmembranas expressas na membrana citoplasmática e são evidenciadas pela primeira vez nos megacarioblastos, que são receptores heterodímeros de adesão constituídos pelas subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) e têm como função facilitar a interação intercelular e a interação com a matriz extracelular.<sup>2</sup> Como muitos receptores plaquetários pertencem à família das integrinas, eles podem ser referidos pela cadeia da integrina GPIIb/IIIa como  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . As plaquetas de indivíduos que não expressam a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  perdem a capacidade de se ligar ao fibrinogênio, não ocorrendo, assim, a agregação plaquetária. Alguns receptores ainda podem ser designados como CD.<sup>5</sup>

O receptor do fibrinogênio na superfície plaquetária é a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ou GPIIb/IIIa ou CD41/CD61. Produzido no megacariócito e presente também na membrana dos grânulos alfa, corpos densos e sistema canalicular aberto, o gene  $\alpha_{IIb}\beta_3$  é polimórfico: a subunidade  $\alpha_{IIb}$  expressa três alelos, e a  $\beta_3$ , oito.<sup>2</sup> A presença de receptor de fibrinogênio nos grânulos alfa tem como finalidade permitir o armazenamento do fibrinogênio a partir do plasma.<sup>2</sup> A ligação do fibrinogênio ao receptor plaquetário está relacionada com a função de agregação plaquetária e, quando a plaqueta está ativada, a afinidade pelo fibrinogênio é bastante elevada. Nas plaquetas ativadas, outras proteínas de adesão podem-se ligar ao receptor de fibrinogênio, como o fator de von Willebrand, a fibronectina, a vitronectina e a trombospondina. Permitindo a adesão ao subendotélio, essa capacidade de adesão somente se manifesta quando a plaqueta está ativada.<sup>2</sup> A ligação do fibrinogênio à GPIIb/IIIa resulta em uma transmissão de sinal para o interior da plaqueta, levando à ativação celular, que inclui a regulação da fosforilação de tirosinas, a junção das proteínas do citoesqueleto e a entrada de cálcio.<sup>2</sup> A presença desse receptor é fundamental para a ativação plaquetária; na sua ausência, o paciente apresenta uma doença hemorrágica chamada de tromboastenia de Glanzmann.<sup>2</sup>

O principal receptor para o colágeno é a integrina GPIa/IIa, ou  $\alpha_2\beta_1$ , ou VLA-2 ou CD49b/CD29, que induz a adesão plaquetária quando o colágeno subendotelial é exposto.<sup>5</sup> É o receptor que induz a agregação plaquetária *in vitro* pelo colágeno e apresenta um polimorfismo no gene  $\alpha_2$  com expressão de quatro alelos.<sup>2</sup>

O receptor GPIb pertence à família de glicoproteínas ricas em leucina e está relacionado com a



adesão e agregação plaquetária, interagindo com as estruturas subendoteliais, como o colágeno via fator de von Willebrand.<sup>2,5</sup> O GPIb também é um receptor para o fator de von Willebrand.<sup>12</sup> O receptor GPIb está presente na membrana plaquetária em diferentes subunidades (GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX e GPIV). Esse complexo apresenta um polimorfismo na subunidade GP Ib $\alpha$  que pode levar à expressão de quatro diferentes tipos de polipeptídeos (VNTR A, VNTR B, VNTR C e VNTR D), os quais variam na quantidade de aminoácidos, o que acarreta uma afinidade maior de ligação ao fator de von Willebrand e à trombina.<sup>2</sup> Outro polimorfismo do GPIb é a substituição de um aminoácido na posição 145, ocasionando a presença de dois tipos de alelos.<sup>2</sup> A ativação plaquetária mediada pela trombina é importante na formação de micropartículas plaquetárias e na atividade pró-coagulante.<sup>5</sup> Esse receptor também está associado à actina, tendo função na manutenção da forma plaquetária e de união das proteínas do citoesqueleto.<sup>2</sup>

O receptor para a fibronectina é a integrina  $\alpha_5\beta_1$ , ou GPIIb/IIIa, ou VLA-5 ou CD49e/CD29, que parece ter função na interação entre os megacariócitos e a matriz extracelular da medula óssea.<sup>2</sup>

O PECAM-1 ou CD31 é uma glicoproteína que pertence à família das imunoglobulinas e tem função na adesão e agregação plaquetária.<sup>2</sup>

O Fc $\gamma$ RIIA ou CD32 é um receptor de imunoglobulina que pode se ligar a imunocomplexos gerados em determinadas patologias.<sup>2</sup>

### Citoesqueleto plaquetário

O citoesqueleto está localizado abaixo da membrana citoplasmática e representa uma rede fina e alongada de tetrâmeros de espectrina que se ligam a filamentos de actina.<sup>2</sup> Uma proteína ligadora de actina une-se à glicoproteína transmembrana GPIb $\alpha$  e à actina e as conecta à rede de espectrina; esse complexo forma o citoesqueleto plaquetário que, além de manter a forma discoide da plaqueta, auxilia na distribuição linear dos receptores da membrana.<sup>2</sup> O receptor GPIb $\alpha$  e o  $\alpha_{IIb}\beta_3$  participam da ligação da plaqueta ao subendotélio no meio extracelular e estão ligados às proteínas do citoesqueleto no meio intracelular.<sup>2</sup> O citoesqueleto também é importante para a mudança de forma da plaqueta após a adesão plaquetária, dando origem a uma forma ameboide com projeção de múltiplos pseudópodos. A mudança de forma está associada à função plaquetária (agregação e secreção do conteúdo das organelas).

Os microtúbulos estão presentes logo abaixo da membrana citoplasmática e mantêm a forma da plaqueta. São polímeros constituídos por duas subunidades de proteína:  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina associadas com várias proteínas de alto peso molecular.<sup>2</sup>

Os microfilamentos são ricos em actina e têm papel na mudança de forma da plaqueta.<sup>2</sup>

### Organelas plaquetárias

As organelas plaquetárias são os peroxissomos, as mitocôndrias, os lisossomos, os corpos densos e os grânulos alfa.

Os peroxissomos participam do metabolismo dos lipídeos e da síntese do fator ativador de plaquetas (PAF, do inglês *platelet-activating factor*); as mitocôndrias plaquetárias têm a finalidade de gerar energia pelo metabolismo oxidativo; e os lisossomos plaquetários secretam várias enzimas, as que apresentam atividade de elastases e colagenases contribuem para o dano vascular no local de formação do trombo plaquetário.<sup>2</sup>

As principais organelas plaquetárias relacionadas com a atividade hemostática são os corpos densos e os grânulos alfa.

As plaquetas contêm cerca de 3 a 8 corpos densos que apresentam uma alta concentração de cálcio, serotonina, ADP e adenosina trifosfato (ATP), sendo que a concentração de ADP é maior que a de ATP (na relação de 2ATP:3ADP).<sup>2</sup> A secreção do conteúdo dos corpos densos, principalmente da ADP, está relacionada com a função plaquetária de agregação. A ADP é um importante indutor da agregação plaquetária e também recruta novas plaquetas.<sup>2,5</sup> A ATP é um potente agonista para outras células do sangue.<sup>5</sup> Os corpos densos movem-se para a superfície plaquetária durante a ativação, e o seu número diminui durante a mudança de forma da plaqueta e durante a retração do coágulo.<sup>2</sup>

A membrana dos corpos densos contém glicoproteínas, como CD36, LAMP-2, P-selectina, GPIIb/IIIa e GPIb/IX, e a ausência dessas proteínas transmembranas está associada com patologias plaquetárias.<sup>2</sup>

Os grânulos alfa são as organelas mais abundantes das plaquetas. Várias substâncias estão presentes nos grânulos alfa e as mais importantes são as seguintes: fator plaquetário 4 (é uma glicoproteína que apresenta uma alta afinidade com a heparina e inibe a sua ação anticoagulante), fator de von Willebrand, fator V, fibrinogênio, vitronectina, inibidor dos ativadores do plasminogênio,



colágeno, heparina, proteína S, fator de crescimento derivado de plaquetas ([PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*], é uma proteína catiônica constituída por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes de dissulfeto que tem a função de fazer a reparação da lesão vascular) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*).<sup>2</sup>

A P-selectina também é uma proteína de membrana localizada nos grânulos alfa que está ausente na membrana das plaquetas não ativadas.<sup>5</sup> Quando as plaquetas estão ativadas, essa proteína (P-selectina) expressa-se na superfície plaquetária e interage com monócitos e neutrófilos, levando à migração dessas células para o local em que o trombo está sendo formado.<sup>5</sup>

### Sistema de membrana da plaqueta

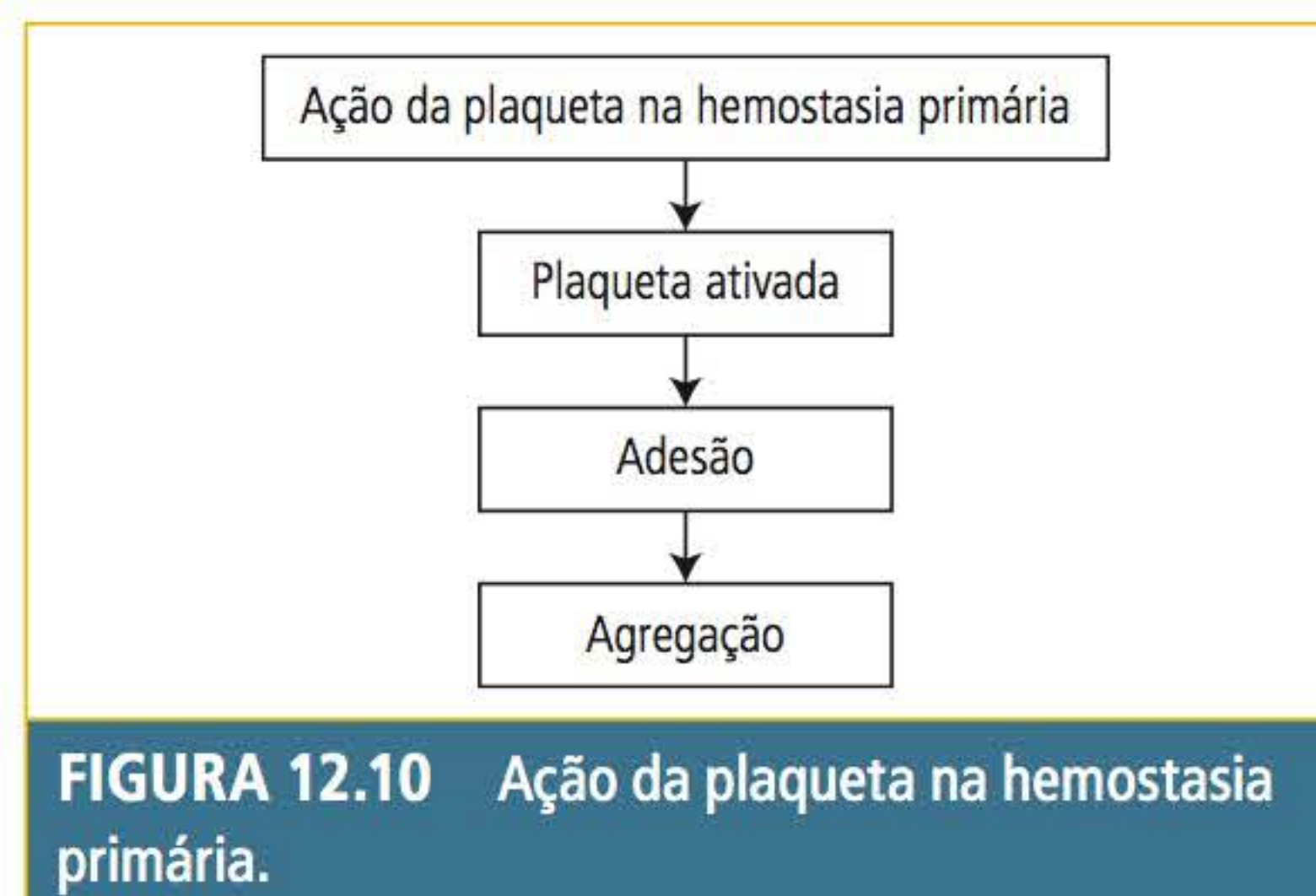
O sistema canicular aberto (SCA) inicia na membrana citoplasmática e vai para o interior da plaqueta, constituindo uma rede de vesículas e canais, os quais se comunicam com o meio externo.<sup>2</sup> Pelo SCA, substâncias externas à plaqueta podem migrar para o seu interior, bem como a secreção do conteúdo dos grânulos ganha o meio externo. A membrana do SCA contribui para a expansão plaquetária durante a mudança de forma na agregação. Representa também o local de estoque das glicoproteínas da membrana citoplasmática.

O sistema tubular denso (STD) é um sistema fechado caracterizado como um retículo endoplasmático residual e está situado muito próximo do SCA.<sup>2</sup> Está relacionado com a liberação de cálcio, por ser o local de seu armazenamento, sendo o maior sítio de produção de prostaglandinas e tromboxane porque suas membranas são ricas em fosfolípidos.

### Ativação plaquetária

Toda vez que um vaso sanguíneo é lesado, ocorre a adesão de plaquetas ao local. A lesão vascular pode ocorrer por alteração do fluxo sanguíneo, aumento da turbulência, traumatismo e processo inflamatório/infeccioso. A adesão plaquetária inicial é um processo passivo que gera uma ativação celular. A lesão vascular expõe a matriz subendotelial ao sangue periférico, e as plaquetas aderem-se ao colágeno, à fibronectina, à laminina e à trombospondina; cada uma dessas proteínas tem um receptor específico. A interação da plaqueta com o subendotélio requer a participação do fator de von Willebrand, o qual se liga ao colágeno exposto e a

receptores da plaqueta, como GPIb/IX/V e GPIa/IIa. A **Figura 12.10** esquematiza a ação da plaqueta na hemostasia primária.



**FIGURA 12.10** Ação da plaqueta na hemostasia primária.

Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

Quando ocorre lesão das células endoteliais, as plaquetas aderem-se ao local da lesão devido à exposição de colágeno e do fator de von Willebrand,<sup>12</sup> o qual é secretado pela célula endotelial e também está presente no plasma. As plaquetas aderem-se ao local lesado porque se ligam ao fator de von Willebrand (via receptores GPIb/IX/V e GPIa/IIa) e ao colágeno pelo receptor GPIa/IIa.<sup>12</sup> Após a adesão plaquetária, ocorre uma mudança conformacional no receptor  $\alpha_2\beta_3$ ,<sup>12</sup> que é uma integrina que se torna ativada, possibilitando uma ligação de alta afinidade com o fibrinogênio e com o fator de von Willebrand, inclusive o fator de von Willebrand que está ligado ao colágeno no sítio lesado.<sup>12</sup> A agregação plaquetária ocorre quando o fibrinogênio e o fator de von Willebrand fazem ligações cruzadas entre os receptores  $\alpha_2\beta_3$  de duas diferentes plaquetas.<sup>12</sup> Após a adesão e agregação plaquetária, há exposição na superfície plaquetária de fosfolípidos carregados negativamente, liberação de fator V e liberação de micropartículas plaquetárias pró-coagulantes;<sup>12</sup> desse modo, ocorre a interação entre as plaquetas e os fatores de coagulação (especificamente com os fatores IX, VIII, V e X). A plaqueta ativada também expressa, na sua superfície, a P-selectina, que permite a interação da plaqueta com os leucócitos (neutrófilos e monócitos).<sup>12</sup> Várias substâncias que são agregantes plaquetários são liberadas, sintetizadas ou estão presentes no local lesado; essas substâncias são as que seguem:<sup>12</sup> trombina, tromboxano  $A_2$ , ADP, epinefrina, serotonina, vasopressina, trombospondina, fator de von Willebrand, fibrinogênio, fator ativador de plaquetas, complexos imunes,



plasmina e ativador tecidual do plasminogênio. A ativação plaquetária ocorre por mecanismos de transdução via ácido aracdônico,<sup>12</sup> proteína C quinase, fosfatases, cálcio ou reorganização do citoesqueleto. No local da lesão vascular, pode haver liberação de ADP pelos eritrócitos, o que contribui para a ativação plaquetária.<sup>12</sup>

Uma das consequências da ativação plaquetária (agregação) é a secreção plaquetária, que consiste na liberação (ao meio externo) do conteúdo dos grânulos plaquetários (grânulos alfa e corpos densos). A agregação plaquetária (mudança de forma) requer a reorganização do citoesqueleto plaquetário. A agregação plaquetária seguida da secreção do conteúdo das organelas aumenta a ativação plaquetária e ativa novas plaquetas.

Os receptores plaquetários representados por glicoproteínas que se expressam na membrana citoplasmática fazem a interação entre o meio interno da plaqueta e o ambiente externo; os receptores podem receber estímulos externos e repassá-los para o interior da plaqueta.<sup>12</sup> Os receptores também podem receber uma sinalização interna, e isso pode modificar a sua conformação na membrana plaquetária. Os agonistas plaquetários ligam-se a receptores de duas categorias: receptores de proteína G (GPCR, do inglês *G protein coupled receptor*) e receptores que podem iniciar a fosforilação de proteínas específicas.<sup>12</sup>

Os GPCRs são proteínas transmembrana, que passam de dentro para fora da membrana sete vezes, são proteínas heterotriméricas que, quando ligadas ao seu agonista, dissociam-se em três subunidades:  $G_i$ ,  $G_q$  e  $G_{12/13}$ .<sup>12</sup>

A subunidade  $G_i$  inibe a enzima adenilciclase e faz com que os níveis de AMP cíclico (AMPC) fiquem baixos; níveis elevados de AMPC inibem a ativação plaquetária.<sup>12</sup> A subunidade  $G_q$  ativa a fosfolipase B (PLB), que faz a hidrólise de um lipídeo de membrana, o fosfatidilinositol difosfato ( $PIP_2$ ), gerando diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato ( $IP_3$ ). O primeiro composto gerado  $PIP_2$  ativa uma proteinoquinase (PKC), e o segundo (DAG) aumenta o nível intracelular de cálcio.<sup>12</sup> O aumento da concentração de cálcio resulta na ativação de enzimas sinalizadoras e proteínas que estão envolvidas com a reorganização do citoesqueleto.<sup>12</sup> A subunidade  $G_{12/13}$  regula a via de ativação das proteínas ligadoras de GTP.<sup>12</sup> A inibição da adenilciclase e a ativação da PKC e da via das proteínas ligadoras de GTP tornam ativado o

receptor do fibrinogênio e do fator de von Willebrand, o  $\alpha_2\beta_3$ .

A ligação da plaqueta com o colágeno (via receptor GPVI) com o fator de von Willebrand e com a trombina (via receptor GPIb-IX-V) faz a ativação da fosforilase  $\gamma_2$ . Essa ativação também muda a conformação do receptor  $\alpha_2\beta_3$ , tornando-o ativado.

A ativação do  $\alpha_2\beta_3$  leva ao aumento da afinidade da plaqueta pelo fibrinogênio e pelo fator de von Willebrand, permitindo a agregação plaquetária e secreção do conteúdo das organelas. A liberação da ADP e do tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ , liberado a partir do ácido aracdônico) mantém os receptores de GPCR ativados e, com isso, a ativação plaquetária fica mantida.<sup>12</sup>

A plaqueta também expressa receptores para ADP e ATP; esses dois nucleotídeos estão presentes nos corpos densos e são secretados quando a plaqueta está ativada.<sup>12</sup> A ADP pode-se ligar a dois receptores na plaqueta, ambos são receptores heterotriméricos ligadores de proteína G chamados de  $P2Y_1$  e  $P2Y_{12}$ .<sup>12</sup> Quando a ADP se liga ao  $P2Y_1$ , é gerada uma subunidade (a partir da proteína GTP)  $G_{\alpha_Q}$ , que ativa a PLB com consequente ativação da PKC e aumento dos níveis de cálcio intracelular com consequente ativação do  $\alpha_2\beta_3$ . A ligação da ADP ao receptor  $P2Y_{12}$  inibe a adenilciclase e mantém os níveis de AMPC baixos. O receptor para a ATP é o  $P2X_1$ , que é um ligante de canal de cálcio.<sup>12</sup> A ligação da ATP ao seu receptor faz com que aumente o influxo de cálcio para o meio intracelular.<sup>12</sup>

O ácido aracdônico é um constituinte da membrana plaquetária que, em condições fisiológicas (anticogulante), encontra-se esterificado como fosfolipídeo (fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina); quando a plaqueta é ativada, ocorre hidrólise desses fosfolipídeos, e o ácido aracdônico é liberado.<sup>12</sup> A hidrólise dos fosfolipídeos é feita pela fosfolipase  $A_2$  e fosfolipase C.<sup>2</sup> A fosfolipase  $A_2$  é ativada pela proteína G, uma proteína transdutora de sinal, que faz a ativação após a ligação do agente agregante ao seu receptor na membrana plaquetária. O ácido aracdônico pode ser metabolizado por duas vias: via da lipo-oxigenase e da cicloxigenase, sendo a mais importante a via da cicloxigenase.

Por ação da enzima cicloxigenase, formam-se endoperóxidos muito instáveis ( $PGG_2$  e  $PGH_2$ ) e, posteriormente, prostaglandinas ( $PGD_2$ ,  $PGG_2$  e



PGF<sub>2</sub>α) que, por fim, são convertidos em tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) por ação da tromboxano sintetase.<sup>2</sup> O TXA<sub>2</sub> difunde-se para o exterior da plaqueta e amplifica a ativação plaquetária ativando a fosfolipase C, induzindo a respostas intracelulares mediadas pelo IP<sub>3</sub> (inositol-1,4-trifosfato) e DG (diacilglicerol), fazendo a liberação da ADP dos corpos densos, do fibrinogênio, do fator de von Willebrand, da trombospondina e do conteúdo dos grânulos alfa.<sup>2</sup>

A via da lipo-oxigenase metaboliza o ácido aracdônico a 12-HETE (ácido-12-hidroperoxidoeicosatetraenoico, também chamado de leucotrieno); sabe-se que eles têm ação quimiotática para neutrófilos.

A agregação plaquetária estabiliza os agregados plaquetários, determina a emissão de pseudópodos, faz a secreção plaquetária e a retração do coágulo.<sup>2</sup>

A agregação plaquetária pode ocorrer em duas fases: uma descrita como inicial ou reversível e outra dita irreversível. O que determina a evolução de uma fase para a outra é a concentração do agonista plaquetário.<sup>12</sup> A fase irreversível caracteriza-se pela produção do TXA<sub>2</sub> e pela liberação da ADP, o que leva a uma ativação definitiva do receptor  $\alpha_2\beta_3$ , fazendo ligações cruzadas entre esse receptor (plaqueta) e o fibrinogênio e o fator de von Willebrand. Desse modo, ocorre a estabilização do trombo plaquetário, a manutenção da secreção e o início da retração do coágulo.<sup>12</sup>

### Inibição da função plaquetária

A plaqueta deve circular em estado inativado e somente ser ativada quando houver um sítio de lesão vascular. Várias substâncias mantêm a plaqueta inativada: o aumento do AMP cíclico (por ativação da adenilciclase ou inibição da fosfodiesterase, cujo aumento se dá a partir da conversão da ATP tendo como consequência a diminuição da concentração de cálcio), a geração do óxido nítrico e do heparan sulfato pela célula endotelial de PGI<sub>2</sub> e a presença da antitrombina (a inibição da trombina livre impede a ativação das plaquetas). As células endoteliais intactas impedem a exposição do colágeno, e a meia-vida muito curta de substâncias que ativam as plaquetas, como tromboxano A<sub>2</sub>,<sup>12</sup> contribui para a inibição da ativação plaquetária. A necessidade de uma mudança conformacional das integrinas (heterodímeros) para que possam ligar-se ao fibrinogênio representa um mecanismo de manutenção da plaqueta na forma inativada.<sup>2</sup>

### Papel da plaqueta na hemostasia

As plaquetas exercem um papel tanto na hemostasia primária como na secundária. Na microcirculação, onde o sangue circula por arteríolas, vênulas e capilares, a hemostasia é realizada pelas plaquetas e vasos sanguíneos (hemostasia primária).

Na hemostasia secundária, o papel das plaquetas é servir como local físico de interação dos fatores da coagulação, e isso acontece em função da sua superfície citoplasmática fosfolipídica com a plaqueta em estado ativado.<sup>2</sup> A primeira interação é a formação do complexo que vai ativar o fator X. O fator IX ativado interage com o fator VIII ativado sobre a superfície plaquetária na presença do íon cálcio; o complexo formado ativa o fator X. A protrombina é transformada em trombina por ação do complexo do fator X ativado + fator V ativado + cálcio; a interação dos fatores X e V ativados com o cálcio ocorre na superfície plaquetária, com a plaqueta em estado ativado. A produção do fator X ativado é bastante acelerada pela presença da plaqueta, a partir da ligação dos fatores IX e VIII ativados em sua superfície. A ligação do fator X ativado à superfície plaquetária amplifica muito a capacidade de geração de trombina.<sup>2</sup>

A plaqueta também contribui para a hemostasia secundária pela secreção de fatores da coagulação presentes nos grânulos alfa, como o fibrinogênio e o fator V. A plaqueta ainda contém fator XI, fator XIII e cininogênios de alto peso molecular.

A plaqueta faz, também, a retração do coágulo a partir da contração de seu citoplasma por ação da actomiosina.<sup>2</sup>

### Micropartículas plaquetárias

Quando as plaquetas não estão ativadas, os fosfolípidos carregados negativamente, entre eles a fosfatidilserina,<sup>12</sup> estão localizados na parte interna da membrana citoplasmática. Quando as plaquetas são ativadas, elas expõem os fosfolípidos carregados negativamente, e essa reorganização molecular da membrana gera a produção de micropartículas que, por definição, são resíduos da membrana plaquetária carregados negativamente com grande quantidade de fator V ativado e com capacidade de gerar trombina.<sup>12,13</sup> As micropartículas podem ser visualizadas na microscopia eletrônica.<sup>14</sup>

As micropartículas podem-se ligar à fibrina pelos receptores expressos em sua membrana, como  $\alpha_2\beta_3$ , GPIb-IX e P-selectina.<sup>15</sup> Também



podem ligar-se ao fator VIII e ao fator X ativado e podem ativar outras plaquetas (pela via do ácido aracdônico) e células endoteliais e monócitos.<sup>12</sup>

### Púrpuras plaquetárias

As púrpuras são doenças hemorrágicas que se caracterizam por sangramentos mucocutâneos causados por deficiência das plaquetas (quer funcional ou numérica) e dos vasos sanguíneos.<sup>2</sup> O sangramento é evidenciado pela presença de petéquias, equimoses, epistaxes, gengivorragias, sangramento em trato gastrointestinal e em sistema nervoso central, geralmente com história familiar negativa.<sup>2</sup>

### Púrpuras trombocitopênicas

Três causas podem explicar as trombocitopenias: diminuição na produção plaquetária (a causa está na medula óssea), aumento da destruição plaquetária ou consumo (a causa está no sangue periférico ou no baço) e retenção de uma quantidade maior de plaquetas pelo baço.<sup>2</sup> O baço é o responsável pela retirada de plaquetas senescentes da circulação sanguínea; cerca de um terço do total das plaquetas produzidas são retidas pelo baço em situação fisiológica, compondo o *pool* plaquetário esplênico.<sup>2</sup> Na esplenomegalia, o número de plaquetas pode cair proporcionalmente ao aumento do baço, causando trombocitopenia periférica, mas o número total de plaquetas produzidas não se altera.<sup>2</sup> As púrpuras trombocitopênicas podem ser classificadas em hereditárias ou adquiridas.

Pode ocorrer uma agregação plaquetária *in vitro* que, pela formação de grumos plaquetários, leva a uma falsa trombocitopenia, ocorrência também chamada de pseudotrombocitopenia. Os aparelhos que liberam as constantes plaquetárias mostram um VPM (volume plaquetário médio) e uma PDW (variação no tamanho das plaquetas [PDW, do inglês *platelet distribution width*]) aumentados. Essa situação é ocasionada principalmente pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), mas outros anticoagulantes podem causar agregação plaquetária, como citrato de sódio, oxalato de sódio, ácido cítrico dextrose e heparina.<sup>12</sup> A incidência de pseudotrombocitopenia é de 0,09 a 0,21% e representa de 15 a 30% dos casos de trombocitopenia isolados.<sup>12,16</sup> Quando se avalia a porcentagem de incidência, ela parece muito pequena, mas um laboratório que realize cerca de 200 hemogramas/dia fará aproximadamente 72 mil hemogramas/ano, o que significa 152 trombocito-

penias/ano ou 13 pseudotrombocitopenias/mês. A contagem de plaquetas dá um valor baixo porque os grumos são contados pelos aparelhos de automação como uma única plaqueta. A pseudotrombocitopenia é causada pela presença de anticorpos, que não estão associados a nenhum processo patológico e reagem com glicoproteínas da membrana plaquetária que são modificadas ou expostas quando o cálcio é quelado.<sup>12</sup> Esses anticorpos são imunoglobulinas do tipo IgG, IgA ou IgM e são dirigidos contra a glicoproteína IIb/IIIa;<sup>12,17</sup> essa glicoproteína é o receptor para o fibrinogênio (integrina, CD41/CD61) e fator de von Willebrand.<sup>12</sup> Quando o anticorpo se liga à glicoproteína, ocorre uma transmissão de sinal para o interior da plaqueta, ocasionando a ativação celular que inclui a regulação da fosforilação de tirosinas, a junção das proteínas do citoesqueleto e o aumento do nível de cálcio, o que leva à ativação plaquetária, ou seja, à agregação. A pseudotrombocitopenia pode ser resolvida pelo aquecimento da amostra sanguínea a 37°C; os anticorpos reagem à temperatura ambiente ou pela recoleta com citrato de sódio ou heparina e contagem imediatamente após a coleta. É interessante, na recoleta, fazer extensões com e sem o EDTA para verificar a presença e a ausência de grumos plaquetários. Tanto o médico quanto o paciente devem ser informados da pseudotrombocitopenia (ver Capítulo 1, fase pré-analítica em hematologia laboratorial, tópico Anticorpos circulantes).

### Púrpuras trombocitopênicas hereditárias

#### Anemia de Fanconi

A anemia de Fanconi é uma doença que se caracteriza por falência da medula óssea, e a incidência é de 1 em cada 100 mil nascidos vivos.<sup>5</sup> É uma doença de herança autossômica recessiva que se manifesta na infância, afeta todos os homozigotos e é caracterizada citogeneticamente por quebras, deleções e figuras cromossômicas.<sup>2</sup> Essas alterações citogenéticas são devidas a uma deficiência na capacidade de reparo do DNA durante a divisão celular, o que resulta em uma instabilidade cromossômica.<sup>2</sup> A aplasia de medula óssea tem como defeito básico uma lesão na célula-tronco com diminuição das colônias de CFU-E, BFU-E e CFU-GM.<sup>5</sup>

A característica da anemia de Fanconi é uma falência de medula óssea gradual que se inicia na primeira década de vida.<sup>5</sup> A primeira alteração hematológica é a trombocitopenia seguida de



granulocitopenia e anemia.<sup>2</sup> Com a evolução da doença, o mielograma mostra um quadro de hipoplasia medular, e o hemograma mostra pancitopenia.<sup>2</sup> O diagnóstico pode ser feito por biologia molecular ao se pesquisarem as mutações genéticas que causam a doença, sendo as mais frequentes a FA-D (3p 25-3)<sup>18</sup> e a FA-E (6p 21-22),<sup>19</sup> e, por citogenética, ao se pesquisarem as alterações cromossômicas, sendo o primeiro o método de escolha. Cerca de 50% dos pacientes evoluem para síndrome mielodisplásica ou leucemia mieloide aguda.<sup>12</sup>

### Síndrome da ausência de rádio

A síndrome da ausência de rádio com trombocitopenia apresenta como característica clínica ausência de ambos os ossos rádio e trombocitopenia; essa síndrome é diagnosticada ao nascimento devido à ausência óssea.<sup>2</sup> A herança é autossômica recessiva com trombocitopenia, sendo essa mais grave na infância.<sup>2</sup>

### Anomalia de May-Hegglin

A anomalia de May-Hegglin também recebe a denominação de trombocitopenia familiar associada com inclusões leucocitárias,<sup>5</sup> e o padrão de herança é autossômico dominante.<sup>2</sup> A trombocitopenia varia de discreta a moderada e está associada à presença de plaquetas gigantes, cujo tamanho varia entre 30 a 80 fL. Apesar dessa característica morfológica, as plaquetas são funcionais, e o sangramento está associado à intensidade da trombocitopenia;<sup>5</sup> o aumento do tempo de sangramento (TS) é proporcional à intensidade da trombocitopenia.<sup>2</sup> As inclusões leucocitárias estão presentes nos neutrófilos, eosinófilos, basófilos e, mais raramente, nos monócitos<sup>5</sup> e caracterizam-se por serem grânulos grandes e acinzentados, que lembram corpúsculos de Döhle.<sup>5,20</sup> São estruturas relacionadas com os ribossomos.<sup>2</sup> Em geral, o paciente é assintomático.<sup>2</sup>

### Síndrome de Wiskott-Aldrich

A síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP, *Wiskott-Aldrich syndrome protein*) é uma herança ligada ao sexo que se caracteriza por apresentar trombocitopenia com plaquetas de pequeno tamanho e anomalia imunológica.<sup>2</sup> O defeito primário é uma mutação no gene *WASP* localizado no cromossomo 11p 11.22<sup>21</sup> e que causa alteração na função plaquetária e linfocitária (trombocitopenia e imunodeficiência).<sup>5</sup> Esses pacientes estão predispostos a um alto risco de contrair septicemia.<sup>5</sup> A causa da trombocitopenia é uma trombopoiese ineficaz associada

a uma sobrevivência diminuída.<sup>2</sup> A contagem de plaquetas varia entre 5.000 a 100.000 plaquetas/ $\mu$ L e, morfológicamente, as plaquetas se caracterizam por serem pequenas.<sup>5</sup> O TS está prolongado e a agregação plaquetária é anormal.

### Síndrome de Bernard-Soulier

A síndrome de Bernard-Soulier é caracterizada por disfunção plaquetária, TS bastante elevado, plaquetas gigantes e trombocitopenia.<sup>22</sup> O sangramento e a disfunção plaquetária na síndrome de Bernard-Soulier são ocasionados por uma deficiência ou disfunção do receptor GPIb-IX-V, que impede a ligação das plaquetas ao fator de von Willebrand.<sup>5</sup> Outro receptor envolvido na síndrome de Bernard Soulier é o GPIIb/IIIa, que também é um receptor do fator de von Willebrand.<sup>2</sup> Várias mutações no cromossomo 17 e 3 já foram descritas; os heterozigotos são assintomáticos, mas têm plaquetas gigantes e níveis reduzidos de GPIb/IX/V.<sup>2</sup> A herança é autossômica recessiva.

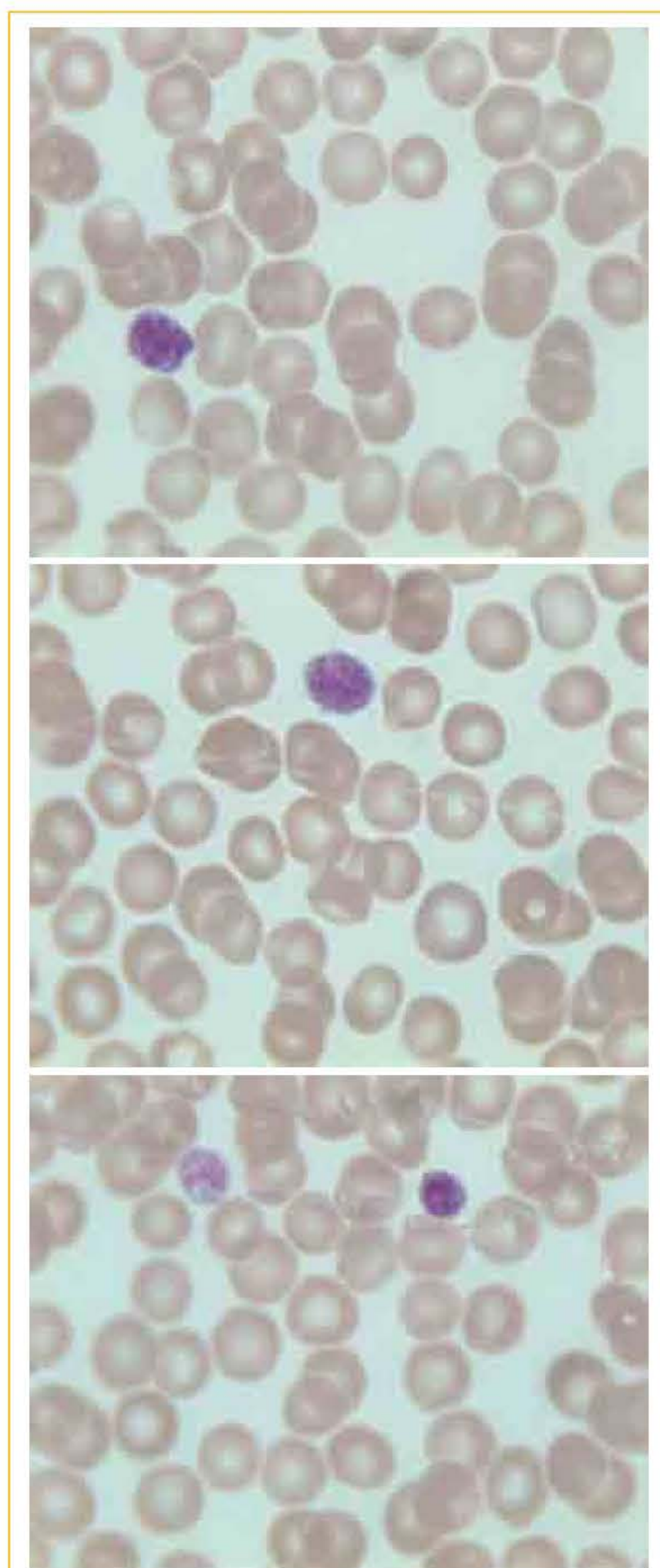
O TS, muitas vezes, está acima de 20 minutos;<sup>23</sup> a trombocitopenia, geralmente, é discreta: já foram descritos pacientes com contagens plaquetárias inferiores a 20.000 plaquetas/ $\mu$ L.<sup>5</sup> A característica dessa síndrome é o aumento do volume plaquetário; as plaquetas são muito grandes e são referidas como plaquetas gigantes. A agregação plaquetária não mostra resposta frente à ristocetina devido à ausência de ligação com o fator de von Willebrand.<sup>2</sup> Uma maneira de diferenciar a doença de von Willebrand da síndrome de Bernard Soulier é a adição de plasma normal, que corrige a agregação na doença de von Willebrand; na síndrome de Bernard Soulier, não há correção.<sup>5</sup> A agregação plaquetária, na síndrome de Bernard-Soulier, ocorre normalmente com ADP, colágeno e epinefrina.<sup>5</sup>

Os pacientes apresentam desde a infância sangramento característico de púrpura: equimoses, epistaxe e gengivorragias. Outras manifestações hemorrágicas são a menorragia e o sangramento pós-parto, gastrointestinal e pós-trauma.<sup>5</sup> A **Figura 12.11** mostra as plaquetas, em uma extensão sanguínea, de um paciente com a síndrome de Bernard-Soulier.

### Púrpuras plaquetárias hereditárias – tromboastenia de Glanzmann

A tromboastenia de Glanzmann se caracteriza por ser uma disfunção plaquetária relacionada com a agregação plaquetária, a herança é autossômica





**FIGURA 12.11** Fotos de plaquetas de um paciente com a síndrome de Bernard-Soulier.

Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

recessiva (os heterozigotos são assintomáticos), e o sangramento é devido a anomalias quantitativas ou qualitativas da glicoproteína GPIIb-IIIa, que é o sítio de ligação da plaqueta ao fibrinogênio, à fibronectina, à vitronectina e ao fator de von Willebrand. A tromboastenia pode ser classificada em tipo 1, tipo 2 ou tipo variante; essa cla-

sificação está baseada na intensidade da deficiência da GPIIb-IIIa.<sup>2</sup> A variante do tipo I caracteriza-se por ter menos de 5% de GPIIb-IIIa, o coágulo é irretrátil, e os grânulos alfa não contêm fibrinogênio.<sup>5</sup> Na variante do tipo II, a quantidade de GPIIb-IIIa está em torno de 10 a 20%, o coágulo é parcialmente retrátil, e os grânulos alfa contêm fibrinogênio.<sup>5</sup> No tipo variante, a concentração de GPIIb-IIIa é igual ou maior que 50%; a anomalia nessa variante é qualitativa e não quantitativa.<sup>5</sup> A forma mais grave da doença é a tromboastenia do tipo I.<sup>2</sup>

A tromboastenia de Glazmann, laboratorialmente, caracteriza-se por TS prolongado e deficiência de agregação plaquetária frente à ADP, ao colágeno e à epinefrina. A agregação frente à trombina, a agregação induzida pela ristocetina e os testes de coagulação são normais, bem como a contagem e a morfologia plaquetária.<sup>2,5</sup> Na extensão sanguínea realizada sem anticoagulante, não são evidenciados pequenos grumos plaquetários (resultantes da agregação plaquetária), como vistos em extensões sanguíneas de indivíduos normais.<sup>2</sup>

#### Defeitos relacionados com a secreção de grânulos alfa

A deficiência de grânulos alfa é uma herança autossômica associada à trombocitopenia de discreta a moderada e TS aumentado.<sup>2</sup> A plaqueta normal se caracteriza por ser de coloração azulada com grânulos púrpura em seu interior; esses grânulos são as organelas plaquetárias. Na deficiência de grânulos alfa, a morfologia plaquetária apresenta-se sem o conteúdo granular e torna-se de coloração acinzentada ou azulada, algumas vezes vacuoladas, e, por esse motivo, esta síndrome também é conhecida como síndrome das plaquetas cinzas (*gray platelets syndrome*).<sup>2</sup>

A contagem plaquetária geralmente varia entre 60 a 100.000 plaquetas/ $\mu$ L, e a agregação plaquetária induzida pela trombina e colágeno geralmente é deficiente.<sup>2</sup> A agregação plaquetária frente à ADP, à epinefrina, ao ácido araquidônico e à ristocetina é normal.<sup>5</sup>

#### Defeitos relacionados com a secreção dos corpos densos

A deficiência de corpos densos, doença de *pool* de estoque, está relacionada com a falta de liberação de ADP, ATP e serotonina.<sup>2</sup> É uma doença



de herança autossômica recessiva.<sup>2</sup> A contagem e a morfologia plaquetária são normais, a agregação é anormal frente à ADP, epinefrina e baixas concentrações de trombina.<sup>2</sup> O TS geralmente é prolongado.<sup>5</sup>

### Púrpuras trombocitopênicas adquiridas

A aplasia megacariocítica é uma doença rara que se caracteriza pela ausência ou hipoplasia megacariocítica com consequente trombocitopenia grave em sangue periférico. A causa provável é o desenvolvimento de autoanticorpos contra os megacariócitos ou trombopoietina.<sup>2</sup>

Os processos infecciosos de etiologia viral ou bacteriana ou por protozoários são causa comum de trombocitopenia.<sup>2</sup> Nos processos infecciosos de etiologia viral, a trombocitopenia pode ocorrer por invasão do vírus no megacariócito, impedindo a produção plaquetária; as proteínas virais podem ter um efeito tóxico sobre precursores plaquetários. O vírus pode induzir a fagocitose ou aumentar a destruição plaquetária pelo baço devido à deposição de partículas virais sobre a plaqueta.<sup>2</sup> Os vírus que caracteristicamente fazem trombocitopenia são os que seguem: citomegalovírus, Epstein-Barr, vírus da dengue, hantavírus e o HIV.<sup>2</sup> Nas infecções bacterianas, a trombocitopenia está associada à septicemia causada por bactérias gram-negativas e gram-positivas, podendo ser também um quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD). A trombocitopenia também pode ser causada por uma ação direta da toxina bacteriana. Pacientes com infecção bacteriana e trombocitopenia devem ser avaliados quanto à possibilidade de um quadro clínico de CIVD. A trombocitopenia também está associada às infecções por malária.<sup>2</sup>

A vitamina B<sub>12</sub> e o ácido fólico são essenciais para a divisão celular porque participam da via metabólica de síntese da timina. Uma das características da anemia megaloblástica é a pancitopenia pela incapacidade de duplicar o DNA. Pancitopenia refere-se à diminuição no sangue periférico das três linhagens celulares: série vermelha, branca e plaquetária. A trombocitopenia é uma das características hematológicas na deficiência da vitamina B<sub>12</sub> e folato.

A trombocitopenia também está presente nas síndromes mielodisplásicas e nas neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas e mielomas).

### Púrpuras trombocitopênicas por aumento da destruição ou consumo

#### Púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome urêmica hemolítica

A púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) não pode ser separada da síndrome hemolítico-urêmica (SHU) porque nas duas situações, ocorrem anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia, podendo haver ainda alterações neurológicas, renais e febre.<sup>2</sup> São entidades com fisiopatologia distintas. Na PTT, ocorre uma deficiência genética ou adquirida da enzima que cliva os multímeros do fator de von Willebrand, a ADAMTS13, e na SHU, não ocorre deficiência dessa enzima.<sup>5</sup>

A PTT e a SHU podem ser classificadas em genética e adquirida. A genética é chamada de microangiopatia trombótica familiar (TMA, do inglês *thrombotic microangiopathies*), que pode ser uma deficiência do fator H (presente na SHU) ou deficiência da enzima ADAMTS13 (presente na PTT).<sup>5</sup>

A TMA-SHU é menos comum que a adquirida, pode ser de herança autossômica dominante ou recessiva<sup>5</sup> e apresenta baixos níveis de complemento causado pela deficiência do fator H,<sup>23</sup> uma doença crônica que cursa com hipertensão e insuficiência renal.<sup>5,24</sup> O fator H é uma proteína de síntese hepática que tem como função a regulação da ativação do sistema complemento no plasma e limita a ativação do complemento sobre superfícies celulares como o endotélio.<sup>25</sup> O gene que codifica o fator H é chamado de HFI e está localizado no cromossomo 1,<sup>24</sup> e mutações nesse gene levam à deficiência do fator H. Cerca de 20% dos casos esporádicos de SHU são devidos a deficiências ou disfunções do fator H.<sup>5</sup>

A SHU adquirida pode ser classificada em SHU da infância e SHU de adultos.<sup>12</sup> A SHU da infância está associada a *Escherichia coli* 0157:H7, sendo que a causa da hemólise não está bem estabelecida; provavelmente, é devida à ação direta do agente infeccioso sobre os eritrócitos.<sup>12</sup> Nos adultos, a SHU pode ser idiopática ou estar associada a outras condições, como processos infecciosos, indução por drogas (quinino, ticlopidina, mitomicina C e ciclosporina), transplante alogênico de medula óssea, metástase, gestação e doenças autoimunes (lúpus eritematoso, síndrome antifosfolípideo e escleroderma).<sup>12</sup> A SHU da infância associada a *Escherichia coli* 0157:H7 ou *Shigella dysenteriae* é causada



após uma infecção entérica aguda (sendo característica de crianças, pode ocorrer em adultos com prognóstico mais grave).<sup>2</sup> A progressão da enterocolite por *Escherichia coli* 0157:H7 para SHU ocorre em 2 a 7% dos casos esporádicos e em cerca de 30% nos casos epidêmicos, e os principais achados laboratoriais são falência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia.<sup>2</sup> O mecanismo básico dessa síndrome é a ativação das células endoteliais, por disseminação via intestinal da toxina bacteriana, dos capilares glomerulares, das arteríolas renais e, de modo não tão intenso, de outros vasos.<sup>14</sup> A anemia frequentemente é grave e acompanhada de leucocitose devido à neutrofilia. A extensão sanguínea mostra policromatofilia, esquizócitos e esferócitos.<sup>14</sup> A contagem de reticulócitos está aumentada, e o teste de Coombs direto é negativo.<sup>14</sup> A bilirrubina indireta, a ureia e a creatinina estão aumentadas.<sup>14</sup> O parcial de urina apresenta hemoglobinúria, hemossiderinúria, proteinúria, hematúria, leucocitúria e cilindrúria.<sup>14</sup> O tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e os produtos de degradação do fibrinogênio estão discretamente elevados.<sup>14</sup> A trombocitopenia pode ser intensa, com contagem de plaquetas em torno de 30.000 plaquetas/ $\mu$ L.<sup>5</sup>

A TMA-PTT ocorre pela deficiência da enzima ADAMTS13, e o evento inicial que leva ao quadro clínico de TMA-PTT é a presença de multímeros de alto peso molecular do fator de von Willebrand no plasma dos pacientes.<sup>2</sup> Os multímeros do fator de von Willebrand encontrados no plasma normal apresentam baixo peso molecular; os multímeros de alto peso molecular são encontrados em função da deficiência da ADAMTS13.<sup>12</sup> Os multímeros de alto peso molecular são capazes de induzir a agregação plaquetária, que pode se tornar disseminada, levando à obstrução arteriolar, o que aumenta a reatividade da plaqueta ao fator de von Willebrand, sendo que esse é o mecanismo primário da TMA-PTT.

Na PTT adquirida, o paciente apresenta anemia hemolítica microangiopática (pode não apresentar anemia, somente hemólise), trombocitopenia, sintomas neurológicos, febre e disfunção renal.<sup>5</sup> Cerca de 40% dos pacientes apresenta os cinco sinais clínicos, enquanto 75% apresentam apenas três sinais clínicos: anemia hemolítica microangiopática (ou só hemólise, sem anemia), sintomas neurológicos e púrpura trombocitopênica.<sup>5</sup>

A PTT tem uma incidência anual de 3,4 casos por milhão,<sup>26</sup> é mais comum em mulheres<sup>5</sup> e tem um pico de incidência na quarta década de vida.<sup>5</sup> Cerca de 40% dos pacientes apresentou um quadro de infecção do trato respiratório superior ou de gripe semanas antes do diagnóstico.<sup>5</sup> A trombocitopenia pode ser grave; cerca de 25% dos pacientes apresentou uma contagem de plaquetas abaixo de 25.000 plaquetas/ $\mu$ L,<sup>5</sup> e 90% têm sangramento mucocutâneo.<sup>5</sup> Os testes de coagulação (TP, TTPa e dosagem do fibrinogênio) são normais ou discretamente elevados; 50% dos pacientes apresentam aumento discreto dos produtos de degradação do fibrinogênio.<sup>5</sup> Os dados laboratoriais demonstram que não há uma ativação da cascata da coagulação, e os trombos formados são ricos em fator de von Willebrand e plaquetas com pouca deposição de fibrina. No laboratório, a insuficiência renal é revelada por hematúria, proteinúria, presença de cilindros e elevação discreta da ureia.<sup>5</sup> A tríade laboratorial característica da PTT são sinais de hemólise com presença de esquizócitos e trombocitopenia.<sup>5</sup> Esse quadro laboratorial é explicado pela deposição de trombos plaquetários (trombocitopenia de consumo) nos vasos, que diminuem o lúmen vascular. Essa obstrução faz com que os eritrócitos rompam-se ao passarem por esses locais, causando o quadro de hemólise e a presença de esquizócitos. Outro achado laboratorial é o aumento da desidrogenase láctica (LDH) devido à hemólise eritrocitária. Esses pacientes também apresentam reticulocitose e células nucleadas vermelhas no sangue periférico, e o teste de Coombs direto é negativo.<sup>5</sup> A causa da PTT idiopática é a deficiência adquirida da ADAMTS13 geralmente associada a autoanticorpos do tipo IgG inibidores de protease.<sup>5</sup>

Outras patologias podem ter sinais clínicos e achados laboratoriais semelhantes à PTT e à SHU, como septicemia, doenças autoimunes, pré-eclâmpsia e a síndrome HELLP (anemia hemolítica microangiopática [H], enzimas hepáticas elevadas [EL] e baixa contagem de plaquetas [LP]) e hipertensão maligna.<sup>2</sup>

A trombocitopenia, na gestante, pode ocorrer durante um quadro de PTT ou SHU associada à gestação ou na pré-eclâmpsia, ou pode ser transitória (no curso da gestação).<sup>2</sup> O quadro de pré-eclâmpsia pode ser definido como a presença de hipertensão com proteinúria e/ou edema, sendo uma doença sistêmica que envolve alterações renais, hepáticas,



cardíacas e do sistema nervoso central.<sup>2</sup> O quadro de eclâmpsia se estabelece a partir de alterações neurológicas agudas na mulher pré-eclâmpsica. A contagem de plaquetas está baixa na pré-eclâmpsia, geralmente mais baixa do que a trombocitopenia transitória da gestação.<sup>2</sup> A pré-eclâmpsia pode evoluir para um quadro de trombocitopenia grave e anemia hemolítica microangiopática (com presença de esquizócitos), levando a um quadro de PTT ou SHU.<sup>2</sup>

A trombocitopenia transitória, que ocorre em cerca de 5 % das gestantes, não tem a etiologia esclarecida e varia entre 130.000 a 150.000 plaquetas/ $\mu$ L. A paciente não tem história anterior de trombocitopenia, a ocorrência é no final da gestação, não há relação com trombocitopenia no feto e a contagem retorna ao normal após o parto.<sup>2</sup>

#### Púrpura trombocitopênica imune

Atualmente, o termo mais adequado para a púrpura trombocitopênica idiopática é o de púrpura trombocitopênica de causa imunológica (PTI),<sup>2</sup> porque a causa da queda do número de plaquetas é mediada por anticorpos dirigidos contra receptores plaquetários como  $\alpha_2\beta_3$  (GPIIb/IIIa) e/ou GPIb/IX ( $\alpha_2\beta_1$ ).<sup>5</sup> A causa da trombocitopenia é a retirada das plaquetas com o anticorpo ligado à sua superfície, pelo baço, o que acarreta uma meia-vida plaquetária reduzida com hiperplasia megacariocítica medular.<sup>2</sup> A hipótese de que a trombocitopenia seja induzida por anticorpos deu-se a partir de estudos em que o sangue total ou o plasma de pacientes com PTI era transfundido para voluntários normais, causando-lhes trombocitopenia; quanto mais plasma fosse transfundido, mais intensa era a queda de plaquetas.<sup>2</sup>

É a causa mais comum de trombocitopenia adquirida, afetando 1 pessoa a cada 10 mil, sendo que metade são crianças.<sup>5</sup> A PTI pode ser dividida em PTI de adultos, PTI de crianças e PTI durante a gestação.

A PTI de adultos ocorre de modo mais comum em mulheres entre a segunda e a terceira décadas de vida,<sup>5</sup> e o início do quadro clínico é súbito. A maioria dos pacientes apresenta contagem de plaquetas entre 5 a 20.000 plaquetas/ $\mu$ L. Pacientes com contagem de plaquetas abaixo de 10.000 plaquetas/ $\mu$ L podem apresentar um quadro de púrpura com epistaxe, gengivorragia, equimoses, hematúria, menorragia e, de modo menos comum, melena.<sup>5</sup> Pacientes com contagem de plaquetas acima de 50.000 plaquetas/ $\mu$ L têm o

quadro de PTI diagnosticado quando realizam hemograma por qualquer outro motivo.<sup>5</sup> A maioria dos pacientes é saudável, não tem outra doença relacionada, a não ser o quadro de sangramento. Alguns pacientes tiveram infecção viral semanas antes do diagnóstico de PTI.<sup>5</sup> O diagnóstico laboratorial é feito pela contagem de plaquetas, a morfologia plaquetária é normal e a realização do TS é contraindicada pela trombocitopenia. A citometria de fluxo pode identificar a presença de imunoglobulinas na superfície plaquetária.

A PTI da infância também se instala de modo súbito, afeta ambos os sexos, e o pico de incidência está entre 3 a 5 anos. A contagem de plaquetas geralmente está entre 20.000 a 30.000 plaquetas/ $\mu$ L.<sup>5</sup> Os sinais clínicos e o diagnóstico laboratorial são os mesmos que para os adultos.

A PTI da gestação ocorre entre 1 a 2 casos a cada 1.000 partos.<sup>27</sup> A maior preocupação deve ser com o feto porque pode haver passagem de anticorpos via placenta, causando uma trombocitopenia neonatal.<sup>5</sup> A PTI pode ser confundida com a trombocitopenia da gestação.

#### Trombocitopenia induzida pela heparina

O mecanismo pelo qual as heparinas (tanto de baixo como de alto peso molecular) induzem a trombocitopenia é mediado via anticorpos.<sup>5,14</sup> Esses anticorpos, geralmente IgG,<sup>5,14</sup> ligam-se ao complexo heparina-fator plaquetário 4 e, simultaneamente, a receptores plaquetários. Essa ligação resulta em intensa ativação plaquetária, formação de micropartículas plaquetárias, trombocitopenia por consumo e estado de hipercoagulabilidade.<sup>5,14,28</sup> O fator plaquetário 4 é uma glicoproteína que está presente nos grânulos alfa das plaquetas e expressa-se na membrana citoplasmática na presença da heparina.<sup>2</sup> O fator plaquetário 4 tem uma alta afinidade pela heparina e inibe sua ação anticoagulante.<sup>2</sup> As micropartículas plaquetárias são trombogênicas porque expressam, na sua superfície, fosfolípidos aniônicos aos quais podem se ligar fatores de coagulação (V, VIII, IX e X) e, com isso, gerar trombina.<sup>5,29</sup> As micropartículas plaquetárias também ativam as células endoteliais.<sup>12</sup> Todo paciente em heparinoterapia (HAPM ou HBPM) deve ter a contagem de plaquetas realizada antes do início (basal) e durante a terapia.<sup>2</sup> As HBPMs apresentam um risco menor de trombocitopenia induzida pela heparina (TIH) porque levam a uma liberação menor de fator plaquetário 4.<sup>5</sup>



A TIH, geralmente, ocorre entre 5 a 10 dias após o início do tratamento.<sup>30</sup> Raramente, a contagem de plaquetas fica abaixo de 100.000 plaquetas/ $\mu$ L,<sup>5</sup> mas pode variar de 20.000 a 100.000 plaquetas/ $\mu$ L,<sup>31</sup> e a suspeita de TIH recai sobre os pacientes que apresentam uma queda de 50 a 70% no número de plaquetas em relação ao valor basal.<sup>31,32</sup>

Os pacientes com TIH não apresentam sangramentos como petéquias, epistaxes ou sangramento em cateter.<sup>33</sup> Os sinais clínicos incluem os sintomas de trombose venosa, como trombose venosa profunda e embolia pulmonar,<sup>33,34</sup> trombose venosa cerebral<sup>35</sup> e trombose arterial.<sup>31</sup> Outras complicações trombóticas comuns são acidente vascular encefálico, infarto do miocárdio, trombose na artéria mesentérica e infarto renal.<sup>31</sup>

Púrpuras plaquetárias

Trombocitopenias por hiperesplenismo

Hiperesplenismo é uma síndrome caracterizada por esplenomegalia associada a uma citopenia (trombocitopenia) ou à bicitopenia, ou à pancitopenia, e essas citopenias são corrigidas após esplenectomia.<sup>5</sup> A esplenomegalia está presente no hiperesplenismo, mas nem todo paciente com esplenomegalia tem hiperesplenismo.<sup>5</sup> Uma quantidade grande de doenças causa esplenomegalia e hiperesplenismo; o **Quadro 12.2**<sup>5</sup> traz a relação dessas doenças.

QUADRO 12.2 Doenças que produzem esplenomegalia e hiperesplenismo
<b>Infecções agudas</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>Virais:</b> hepatite, mononucleose infecciosa e citomegalovírus</li><li>▪ <b>Bacterianas:</b> septicemia, salmonelose e brucelose</li><li>▪ <b>Parasitológicas:</b> toxoplasmose</li></ul>
<b>Infecções subagudas e crônicas</b> Endocardite bacteriana subaguda, tuberculose, malária e doenças fúngicas
<b>Inflamações</b> Síndrome de Felty, lúpus eritematoso sistêmico e febre reumática
<b>Esplenomegalia congestiva</b> Cirrose hepática, obstrução da veia porta, obstrução da veia esplênica e oclusão da veia hepática
<b>Doenças hematológicas</b> Anemias hemolíticas, talassemias e anemia falciforme.
<b>Neoplasias</b> Metaplasia mieloide, policitemia vera, trombocitemia essencial, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica, tricoleucemia, linfomas e leucemias agudas

Fonte: Silva e Hashimoto.<sup>1</sup>

A trombocitopenia no hiperesplenismo é causada pelo aumento do *pool* plaquetário esplênico; um aumento maciço do baço pode reter mais de 90% da massa plaquetária total.<sup>5</sup> Geralmente, no hiperesplenismo, a contagem plaquetária fica em torno de 50.000 a 150.000 plaquetas/ $\mu$ L; contagens de plaquetas abaixo de 20.000 plaquetas/ $\mu$ L sugerem outro diagnóstico.<sup>5</sup> A trombocitopenia no hiperesplenismo ocorre associada à esplenomegalia, à trombocitopenia moderada e à neutropenia moderada; a hemoglobina tem valores normais, e a medula óssea não mostra alteração na hematopoiese.<sup>5</sup>

Trombocitopenia causada por medicamentos

Um grande número de medicamentos que causa trombocitopenia pode simular um quadro de PTI.<sup>36</sup> Em geral, a contagem plaquetária está em torno de 20.000 plaquetas/ $\mu$ L, o paciente apresenta um quadro de púrpura, e, normalmente, a trombocitopenia se manifesta algumas semanas (entre 1 a 2 semanas) após o início do uso do medicamento.<sup>5</sup> O mecanismo da trombocitopenia é a ligação de anticorpos (via medicamento) a receptores plaquetários, entre eles GPIIb/IIIa e GPIb/IX/V; com frequência, a contagem plaquetária é recuperada dias após a interrupção do medicamento.

Alguns medicamentos afetam a função plaquetária e não alteram a contagem das plaquetas. Entre eles, está o ácido acetilsalicílico (AAS) e as tienopiridinas (ticlopidine e clopidrogel). O AAS tem sido usado na clínica médica há mais de cem anos e é o agente antiagregante mais comum associado à disfunção plaquetária.<sup>37</sup> O mecanismo pelo qual o AAS causa a disfunção plaquetária é uma acetilação irreversível da enzima ciclooxigenase, e a consequência é que não há formação do tromboxano A<sub>2</sub>. Doses de AAS de 40 a 100 mg ou mesmo doses tão pequenas quanto 10 mg dadas diariamente no período de uma semana podem inibir completamente a síntese de tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>5</sup> O AAS tem outras ações na hemostasia: diminui a formação tanto da trombina como da fibrina e acelera a fibrinólise. Também interfere na agregação plaquetária feita com epinefrina, ADP, ácido aracdônico e baixas concentrações de colágeno e trombina.<sup>5</sup> O AAS prolonga o TS: já foi demonstrado que uma única dose de AAS pode prolongar o TS por até quatro dias.<sup>38</sup>

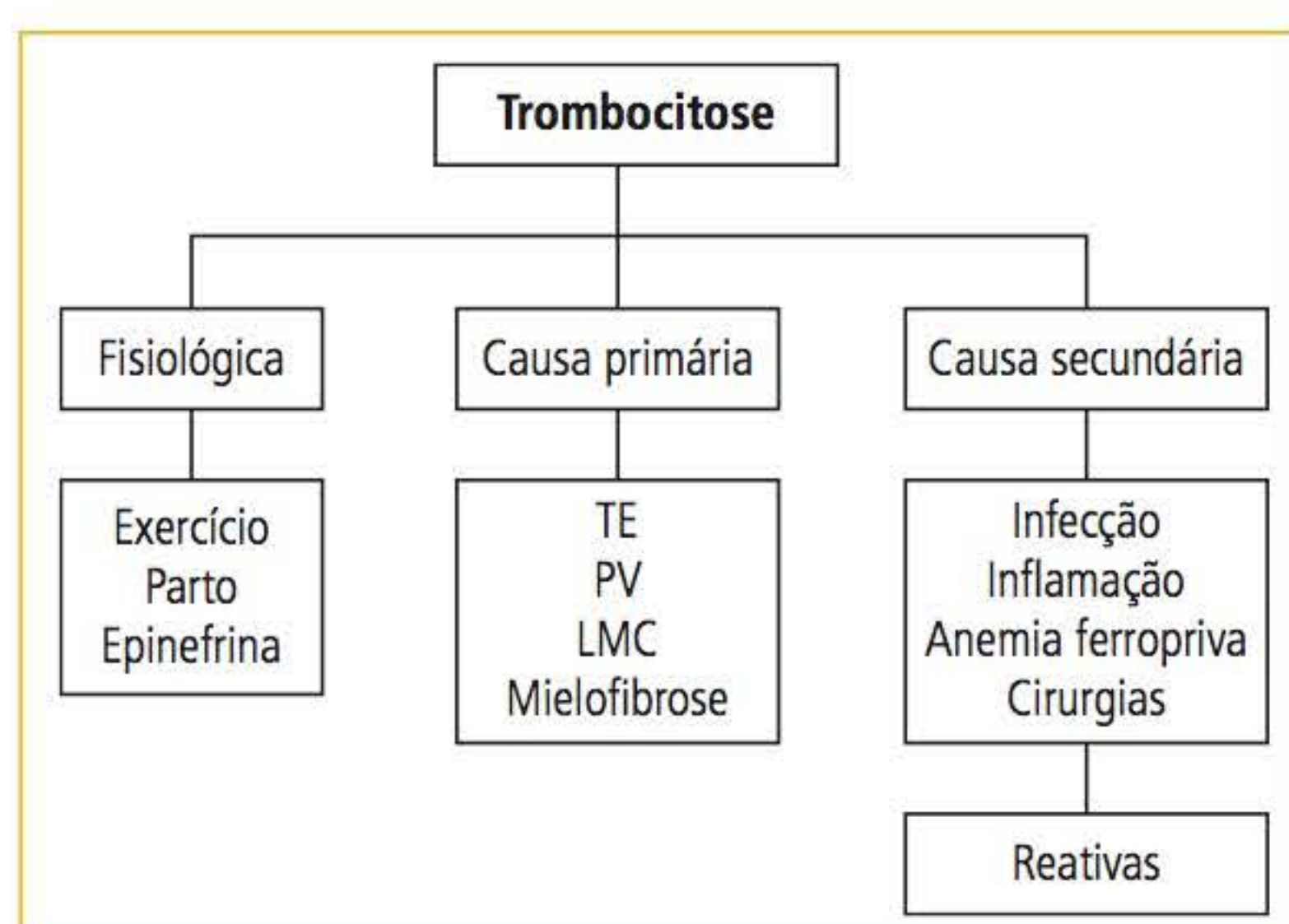
O ticlopidine e o clopidrogel inibem a ativação e agregação plaquetárias por modificarem covalentemente o receptor plaquetário da ADP (PY<sub>12</sub>).



Desse modo, não há inibição da atividade da enzima adenilciclase com consequente inibição da função plaquetária.<sup>5</sup> Esses medicamentos não têm efeito sobre o metabolismo do ácido aracdônico, podem ser usados sinergicamente com o AAS para inibir a função plaquetária.<sup>5</sup>

### Trombocitoses

As trombocitoses podem ser classificadas em fisiológicas e de causa primária ou causa secundária. A **Figura 12.12** mostra a classificação das trombocitoses.



**FIGURA 12.12** Classificação das trombocitoses.

TE, trombocitemia essencial; PV, policitemia vera; LMC, leucemia mieloide crônica.

**Fonte:** Adaptada de Silva e Hashimoto.<sup>2</sup>

A trombocitose fisiológica é um aumento transitório no número de plaquetas ocasionado pela mobilização de plaquetas do *pool* esplênico e não necessariamente pelo aumento de produção de plaquetas pelos megacariócitos.<sup>2</sup> A trombocitose transitória ocorre próximo ao parto, após a realização de exercícios físicos vigorosos e após administração de epinefrina.<sup>2</sup>

Na trombocitose de causa primária, ocorre uma perda do controle de produção das plaquetas e, mesmo que o organismo não necessite de plaquetas, elas são produzidas. As doenças relacionadas com a trombocitose de causa primária são trombocitemia essencial, policitemia vera, leucemia mieloide crônica e mielofibrose.

A trombocitemia essencial é uma doença clonal que causa trombocitose. Há descrições de alterações cromossômicas e de mutações no gene p53 em alguns pacientes.<sup>2</sup> A idade de incidência varia entre 50 a 60 anos,<sup>2</sup> sendo uma doença rara em crianças.<sup>5</sup> Os níveis plasmáticos de trombopoietina podem estar normais ou elevados.<sup>2</sup> Os pacientes

apresentam episódios trombóticos ou hemorrágicos e, geralmente, são assintomáticos ao diagnóstico. A contagem de plaquetas, na maioria das vezes, excede a 1.000.000 de plaquetas/ $\mu$ L, com plaquetas de forma e tamanho anômalos, e fragmentos de megacariócitos podem ser encontrados no sangue periférico; hiperplasia megacariocítica é um achado em medula óssea.<sup>2</sup> A agregação plaquetária é anormal, e grumos plaquetários podem ser encontrados na extensão sanguínea.<sup>5</sup> É interessante que poucos pacientes apresentam TS aumentado, apesar do episódio hemorrágico.<sup>2</sup> Os testes de coagulação (TP e TTPa) são normais.<sup>2</sup> Cerca de 25% dos pacientes apresentam elevação nos níveis de ácido úrico e LDH. A trombocitemia essencial pode ser diferenciada da trombocitose reativa (causa secundária) devido ao paciente, na primeira, apresentar episódios de trombose ou hemorragia, esplenomegalia, alterações citogenéticas e ausência de aumento na concentração de proteínas de fase aguda.<sup>2</sup>

A policitemia vera é uma doença mieloproliferativa de origem clonal, que se caracteriza por aumento no número de eritrócitos e da volemia, podendo ocorrer leucocitose, trombocitose e esplenomegalia.<sup>2</sup> O pico de incidência está em torno de 60 a 80 anos, e os sintomas clínicos são consequência do aumento da viscosidade sanguínea.<sup>2</sup> A série vermelha não apresenta alterações morfológicas significativas; a concentração de hemoglobina varia entre 18 a 24 g/dL, e a contagem de eritrócitos pode estar acima de 7.000.000/ $\mu$ L.<sup>2</sup> A série branca é marcada por leucocitose à custa de neutrofilia (número de leucócitos em torno de 25.000/ $\mu$ L) podendo ser encontrados metamielócitos e até mielócitos.<sup>2</sup> A contagem de plaquetas está elevada e varia entre 500.000 a 1.000.000 de plaquetas/ $\mu$ L, as quais, geralmente, apresentam-se aumentadas em tamanho e com formas anômalas.<sup>2</sup> Ao se realizarem testes de coagulação, deve ser feita a correção do volume de anticoagulante em função do volume globular elevado e da menor quantidade de plasma; quando não se faz a correção, há aumento do TP e TTPa.

A LMC é uma doença mieloproliferativa clonal cuja alteração cromossômica é a translocação t(9;22) que, na citogenética, caracteriza o cromossomo Philadelphia e, pela biologia molecular, o gene quimérico *BCR:ABL*. Na fase crônica da LMC, o hemograma caracteriza-se por apresentar anemia normocítica e normocrômica de intensidade



variável, leucocitose à custa de granulocitose (neutrofilia, eosinofilia e basofilia) e trombocitose. A contagem de plaquetas pode ser superior a 1.000.000 de plaquetas/ $\mu$ L.

A mielofibrose é uma doença mieloproliferativa de origem clonal que se caracteriza pela produção excessiva de colágeno pelos fibroblastos da medula óssea, estimulados por citocinas produzidas por megacariócitos e células endoteliais anormais.<sup>2</sup> É uma doença característica de idades acima de 60 anos, e o paciente apresenta hematopoiese extramedular com produção celular hepática e esplênica.<sup>2</sup> A maioria dos pacientes, ao diagnóstico, apresenta como sinal clínico esplenomegalia.<sup>2</sup> A série vermelha apresenta como alterações características dacriócitos, eritroblastos circulantes, esquizócitos, codócitos e policromatofilia. A trombocitose está presente ao diagnóstico com plaquetas de tamanho aumentado; fragmentos de megacariócitos e até megacariócitos podem ser encontrados no sangue periférico. A função plaquetária está alterada e evidenciada por aumento no TS.<sup>2</sup>

Na trombocitose secundária ou reativa, a contagem de plaquetas pode ser bastante elevada, mas a incidência de episódios trombóticos ou hemorrágicos não é comum.<sup>2</sup> Processos infecciosos, inflamatórios crônicos e cirurgias são causas de trombocitose reativa. É preciso haver cuidado no curso de um processo infeccioso quando ocorre queda no número de plaquetas; nesse caso, deve-se pensar na possibilidade de septicemia e, se associada a esquizócitos e hemólise, em púrpura trombocitopênica trombótica. Pacientes com anemia ferropriva podem apresentar trombocitose e, nessa situação, deve ser pensado em anemia ferropriva por sangramento gastrointestinal, muitas vezes acompanhada de leucocitose à custa de neutrofilia.<sup>2</sup>

## ■ PLAQUETAS E TROMBOSE

O trombo pode ser formado tanto na circulação arterial como na venosa. O trombo arterial (também chamado de trombo branco por reter poucos eritrócitos em seu interior) é formado em locais de fluxo sanguíneo elevado e é composto principalmente de plaquetas. O trombo vermelho é formado em locais de estase venosa, rico em fibrina e com muitos eritrócitos retidos. O trombo arterial geralmente é não oclusivo, mas pode embolizar e obstruir a circulação, com ocorrência frequente nas câmaras cardíacas e nas artérias carótidas

(causando obstrução na circulação cerebral).<sup>2</sup> A trombose intracardíaca está relacionada com lesões nas valvas ou no endotélio.

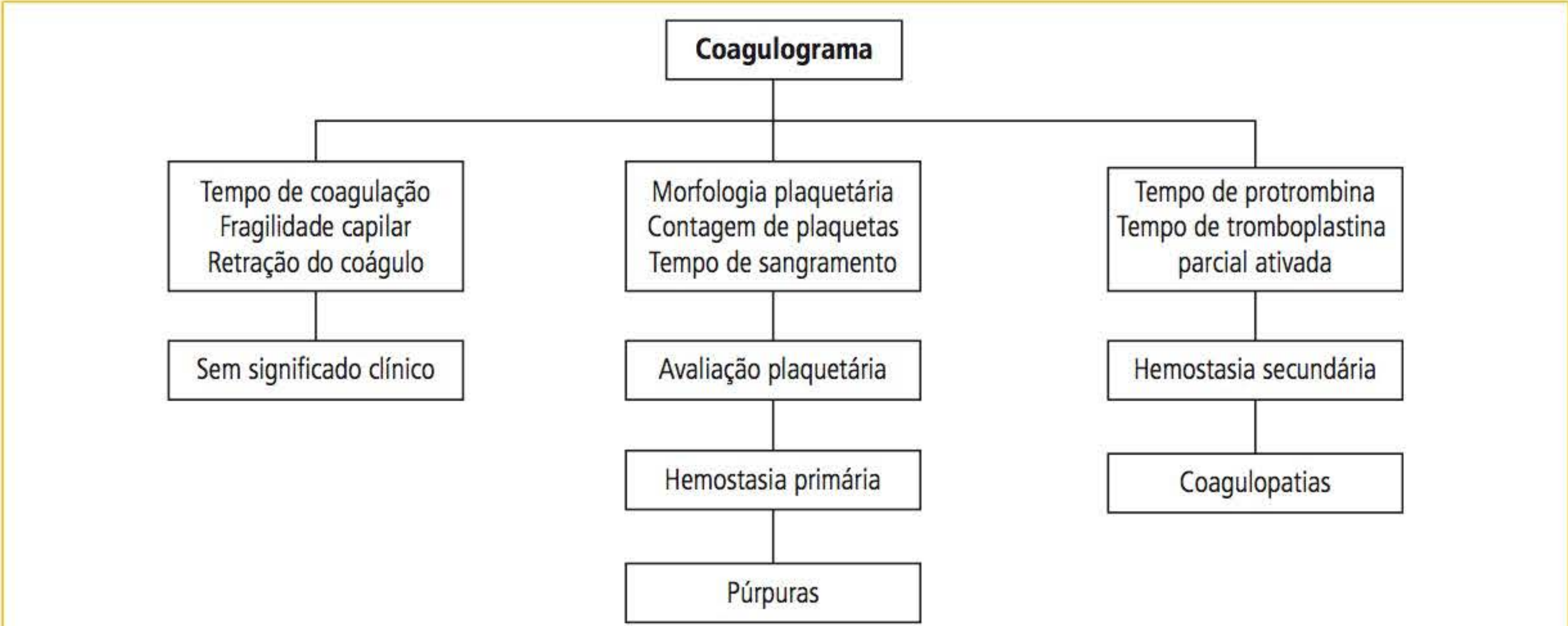
O início da formação do trombo arterial por ação plaquetária requer lesão na célula endotelial e exposição do subendotélio. As plaquetas aderem-se, agregam e se estabelece uma interação entre as plaquetas circulantes e as aderidas. A deposição de novas camadas de plaquetas continua ocorrendo, o trombo plaquetário incorpora-se à parede vascular e libera o fator de crescimento derivado de plaquetas, que leva à proliferação rápida e intensa de fibroblastos, formando a placa aterosclerótica, rica em substâncias aterogênicas.<sup>2</sup> Níveis elevados de LDL-colesterol aumentam a reatividade plaquetária e influenciam a formação e o desenvolvimento do trombo, que pode continuar a crescer, levando ao estabelecimento de um processo inflamatório crônico, que terá como destino a ulceração ou o rompimento da placa aterosclerótica.<sup>2</sup>

O risco de trombose coronariana e de doença cerebrovascular também está correlacionado com o polimorfismo dos receptores plaquetários. No polimorfismo do gene  $\alpha_{IIb}$  e  $\beta_3$ , o alelo PRO 33 está associado a risco maior para trombose coronariana.<sup>2</sup> No polimorfismo do gene  $\alpha_2$ , o alelo 1 está provavelmente associado com um risco maior para doença cerebrovascular e é um risco para doença coronariana arterial e trombose venosa. O polimorfismo do complexo GPIb apresenta um risco aumentado para doença coronariana arterial (VNTR A e VNTR B) e pode ser um risco aumentado para doença cerebrovascular.<sup>2</sup>

## ■ AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HEMOSTASIA PRIMÁRIA

O coagulograma, representado por um conjunto de exames, permite avaliar a resposta hemostática de um indivíduo. Os exames que compõem o coagulograma são o tempo de coagulação, a fragilidade capilar (prova do laço ou do torniquete), a retração do coágulo, a morfologia plaquetária, a contagem de plaquetas, o TS, o TP e o TTPa. Os três primeiros exames, tempo de coagulação, fragilidade capilar e retração do coágulo, são considerados testes obsoletos, destituídos de valor clínico e que não devem mais ser realizados pelo laboratório. Os exames que avaliam a hemostasia primária são a morfologia plaquetária, a contagem de plaquetas e o TS. O laboratório de rotina





**FIGURA 12.13** Exames que compõem o coagulograma.

tem poucos recursos para estabelecer um diagnóstico laboratorial em um paciente com alteração na hemostasia primária. Outros exames que podem estabelecer um diagnóstico laboratorial em alterações da hemostasia primária são a curva de agregação plaquetária e a citometria de fluxo. Esses, no entanto, são exames disponíveis em poucos laboratórios. A **Figura 12.13** representa os exames que compõem o coagulograma.

**Morfologia plaquetária**

A plaqueta normal caracteriza-se por ser um corpúsculo discoide de coloração azulada com grânulos púrpura em seu interior, o que caracteriza a presença das organelas plaquetárias. Em extensões sanguíneas, confeccionadas com sangue sem anticoagulante, é comum encontrar pequenos grumos plaquetários, resultado da agregação plaquetária. Alterações de morfologia, como ausência de grânulos e aumento do volume plaquetário (plaquetas gigantes), e alterações na morfologia discoide (plaquetas de formas anômalas ou bizarras) estão correlacionadas com patologias plaquetárias. A **Figura 12.14** mostra fotos de plaquetas normais.

**Contagem de plaquetas**

As plaquetas devem ser avaliadas quanto ao número, à função e à morfologia. A avaliação numérica é obtida a partir da contagem de plaquetas, a qual deve ser realizada por automação, pois o coeficiente de variação é 2%, enquanto na contagem manual é de 22%.<sup>2</sup>

A contagem manual de plaquetas deve ser feita com muito rigor técnico e, muitas vezes, é

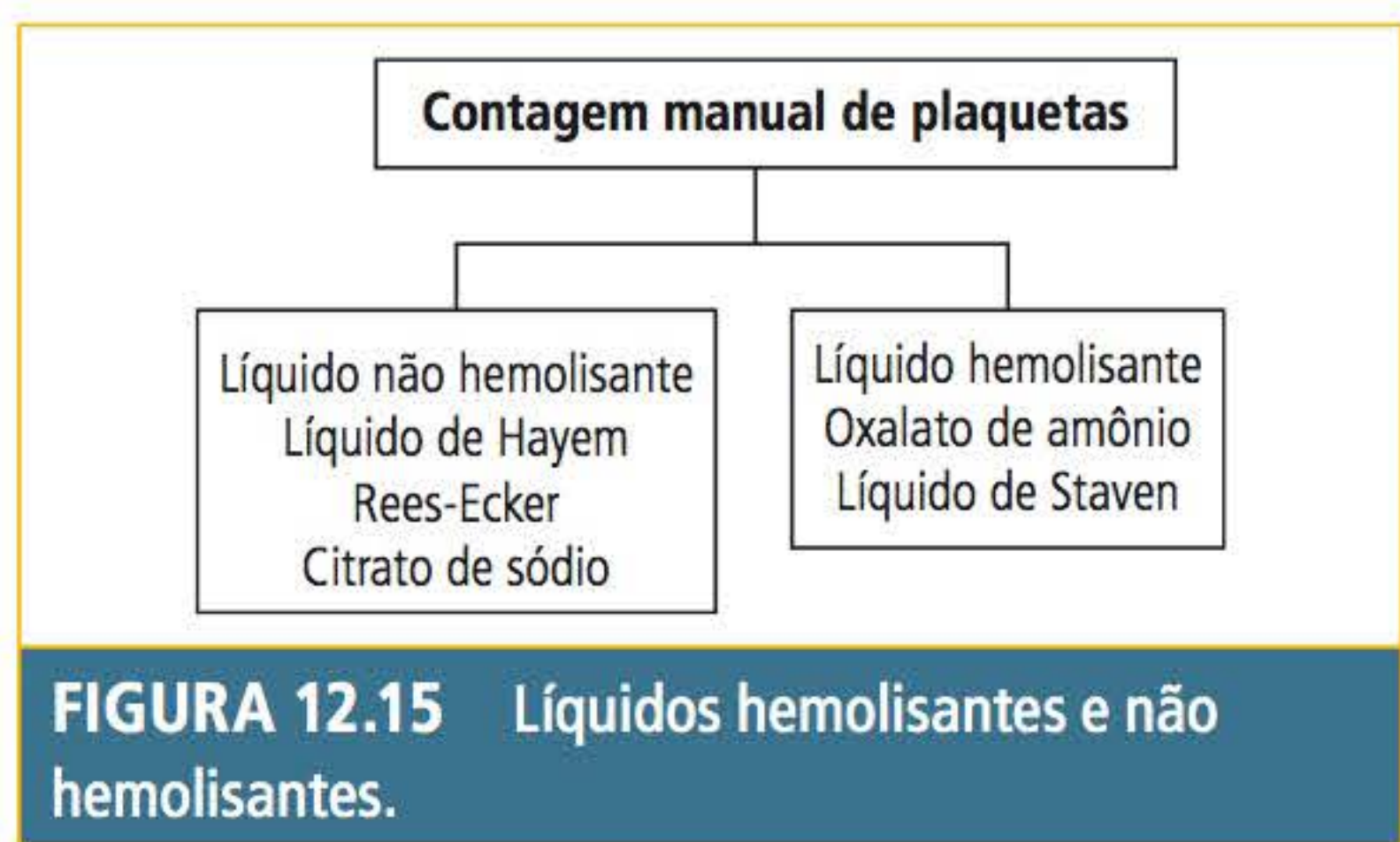


**FIGURA 12.14** Plaquetas normais.

difícil realizá-la. Os líquidos diluentes para a contagem de plaquetas podem ser hemolisantes e não hemolisantes; os primeiros fazem a hemólise eritrocitária. A **Figura 12.15** mostra quais são os líquidos hemolisantes e quais os não hemolisantes.

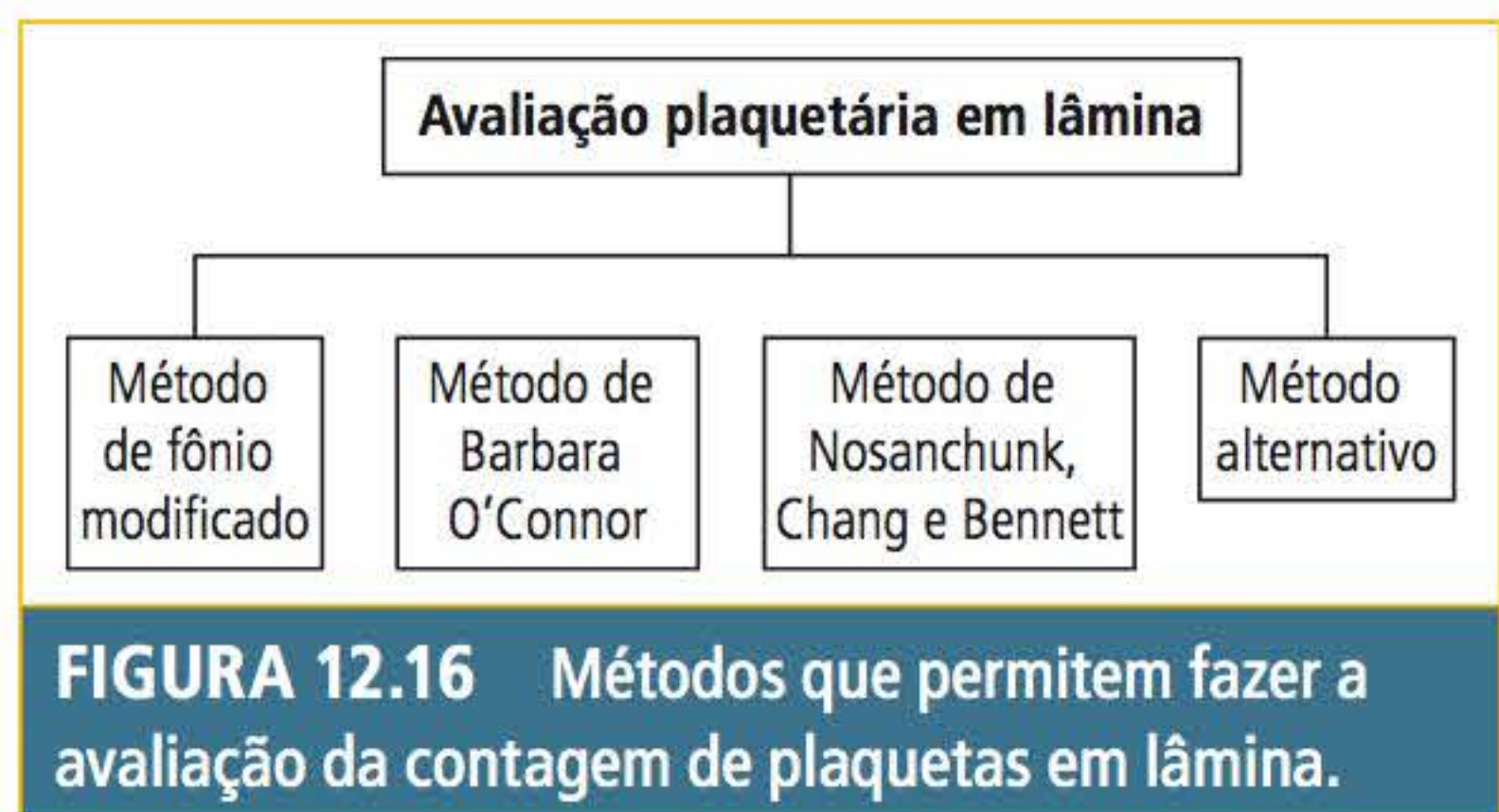
A escolha do diluente depende da preferência de cada profissional. Uma vez escolhido o líquido diluente, ele deve ser filtrado; é interessante que se filtre uma quantidade um pouco maior do que a necessária para as contagens que serão realizadas. A amostra sanguínea deve ser homogeneizada por 15 minutos, principalmente se estiver sem ser manipulada há algum tempo. A diluição recomendada é de 1:200 (20 µL de sangue para 4 mL de líquido diluente) e deve ser modificada caso o número de plaquetas seja muito baixo (diluição menor) ou





muito alto (diluição maior). Após realizada, a diluição deve ser homogeneizada por cinco minutos, e a câmara de Neubauer deve ser preenchida. É recomendável que um dos lados seja preenchido com a diluição e o outro com o líquido diluente (a quantidade a mais filtrada). A câmara de Neubauer deve ser colocada em câmara úmida entre 30 a 40 minutos para que haja sedimentação das plaquetas e, após o tempo de sedimentação, contadas em microscópio ótico. A câmara de Neubauer espelhada facilita a contagem de plaquetas e, caso o laboratório tenha um microscópio com contraste de fase, a contagem se torna bem mais fácil. Antes de fazer a contagem, deve ser verificado o retículo que foi preenchido somente com o líquido diluente, para ver se há partículas em suspensão que possam ser confundidas com plaquetas e, posteriormente, iniciar a contagem no retículo preenchido com a diluição. A contagem de plaquetas é um exame muito importante porque caracteriza a trombocitopenia ou trombocitose, mas não mede a função plaquetária.

Quando se tem uma dúvida quanto ao resultado da contagem de plaquetas, elas podem ser avaliadas, numericamente, a partir de extensões sanguíneas. Vários métodos que permitem essa avaliação estão descritos na literatura.<sup>39</sup> A **Figura 12.16** mostra esses métodos.



Fonte: Adaptada de Comar e colaboradores.<sup>39</sup>

### Método de Fônio Modificado<sup>39</sup>

Diferentemente do método original, que emprega sulfato de magnésio a 14% para evitar a agregação plaquetária do sangue obtido por punção digital, o método modificado utiliza extensões sanguíneas confeccionadas a partir de amostras de sangue total coletadas com K<sub>3</sub>EDTA. Desse ponto em diante, foi seguida a técnica original, na qual, para se realizar a avaliação plaquetária em lâmina, foram contadas, no microscópio ótico, com aumento de 1.000 vezes, plaquetas em 1.000 eritrócitos e, em seguida, foi calculado o número de plaquetas da seguinte forma:

$$\text{Plaquetas}/\mu\text{L} = \frac{\text{NPE} \times \text{NE}}{1.000}$$

NPE = número de plaquetas contadas  
NE = número de eritrócitos/ $\mu\text{L}$

### Método de Bárbara H. O’connor<sup>39</sup>

Para se fazer a avaliação plaquetária por esse método, confeccionam-se extensões sanguíneas a partir de amostras de sangue total coletadas com K<sub>3</sub>EDTA. Contam-se, no microscópio ótico com aumento de 1.000 vezes, plaquetas em 10 campos e, em seguida, calcula-se o valor médio de plaquetas por campo. O valor médio é multiplicado por 13.000 (constante de multiplicação) para se obter o valor estimado de plaquetas/ $\mu\text{L}$ .

### Método de Nosanchunk, Chang e Bennett<sup>39</sup>

Para esse método, também são confeccionadas extensões sanguíneas a partir de amostras de sangue total coletadas com K<sub>3</sub>EDTA. Conta-se, no microscópio ótico com aumento de 1.000 vezes, plaquetas em oito campos. A soma obtida é multiplicada por 2.000 (constante de multiplicação) para se obter o valor estimado de plaquetas/ $\mu\text{L}$ .

### Método alternativo<sup>39</sup>

Para esse método, igualmente, são confeccionadas extensões sanguíneas a partir de amostras de sangue total coletadas com K<sub>3</sub>EDTA. Contam-se, no microscópio ótico com aumento de 1.000 vezes, plaquetas em 10 campos e, em seguida, calcula-se o valor médio de plaquetas por campo. O valor médio é multiplicado pelo valor da concentração de hemoglobina (g/dL) do paciente e, em seguida, multiplicado por 1.000 para obter-se o valor estimado de plaquetas/ $\mu\text{L}$ .



## Tempo de sangramento (TS)

### Técnica:

1. Aplicar uma pressão de 40 mmHg com esfigmomanômetro no antebraço, manter a pressão durante a realização do teste.
2. Escolher uma região logo abaixo da dobra do cotovelo na qual não haja nenhuma veia visível ou palpável. As incisões devem ser feitas nessa região.
3. Fazer assepsia do local predeterminado e, com uma lanceta própria para o TS (profundidade da incisão padronizada de 1 mm), fazer três incisões, manter uma distância de aproximadamente 1 cm entre cada incisão.
4. Após a realização das incisões, acionar o cronômetro e a cada 30 segundos, com auxílio de um papel de filtro, absorver delicadamente o sangue que está fluindo.
5. Quando o sangramento cessar, tem-se o valor do TS.

O valor de referência, na literatura, varia entre 1 a 7 minutos. O procedimento correto é que cada laboratório estabeleça o valor de referência para a população que atende.

O TS mede a função plaquetária, sendo um teste específico para a hemostasia primária. O TS está aumentado nas alterações plaquetárias quantitativas e qualitativas, podendo estar alterado nas púrpuras vasculares. Uma das limitações do TS é que ele não diferencia as alterações plaquetárias das vasculares. É um teste bastante importante porque mede a função plaquetária *in vivo*, mas, para que tenha valor clínico, deve ser feito com bastante rigor técnico. O TS deve ser feito no pré-operatório ou na pesquisa de púrpura ou coagulopatia (especificamente doença de von Willebrand).

Muitos cuidados devem ser tomados durante o procedimento técnico. Quando se faz a incisão, toda a parte perfurante da lanceta deve penetrar a pele. Dispositivos específicos para o TS devem ser encostados firmemente na pele antes de serem acionados. Quando, em duas incisões, o sangue para de fluir e na terceira não, pode-se ter “pego” uma veia e deve ser considerado o valor das duas que pararam de sangrar. Quando realizado em polpa digital ou lobo da orelha, o TS não tem valor diagnóstico por serem locais de difícil padronização técnica. O TS realizado no lóbulo da orelha (método de Duke) não é sensível ao tratamento com AAS.<sup>40</sup>

Em algumas situações, o TS não deve ser realizado, como no caso de pacientes na vigência de púrpura ou em uso de antiagregantes plaquetários (dependendo da concentração utilizada) porque nessas situações o sangramento causado pelo exame pode não parar, sendo necessária uma intervenção com trombina tópica, por exemplo.

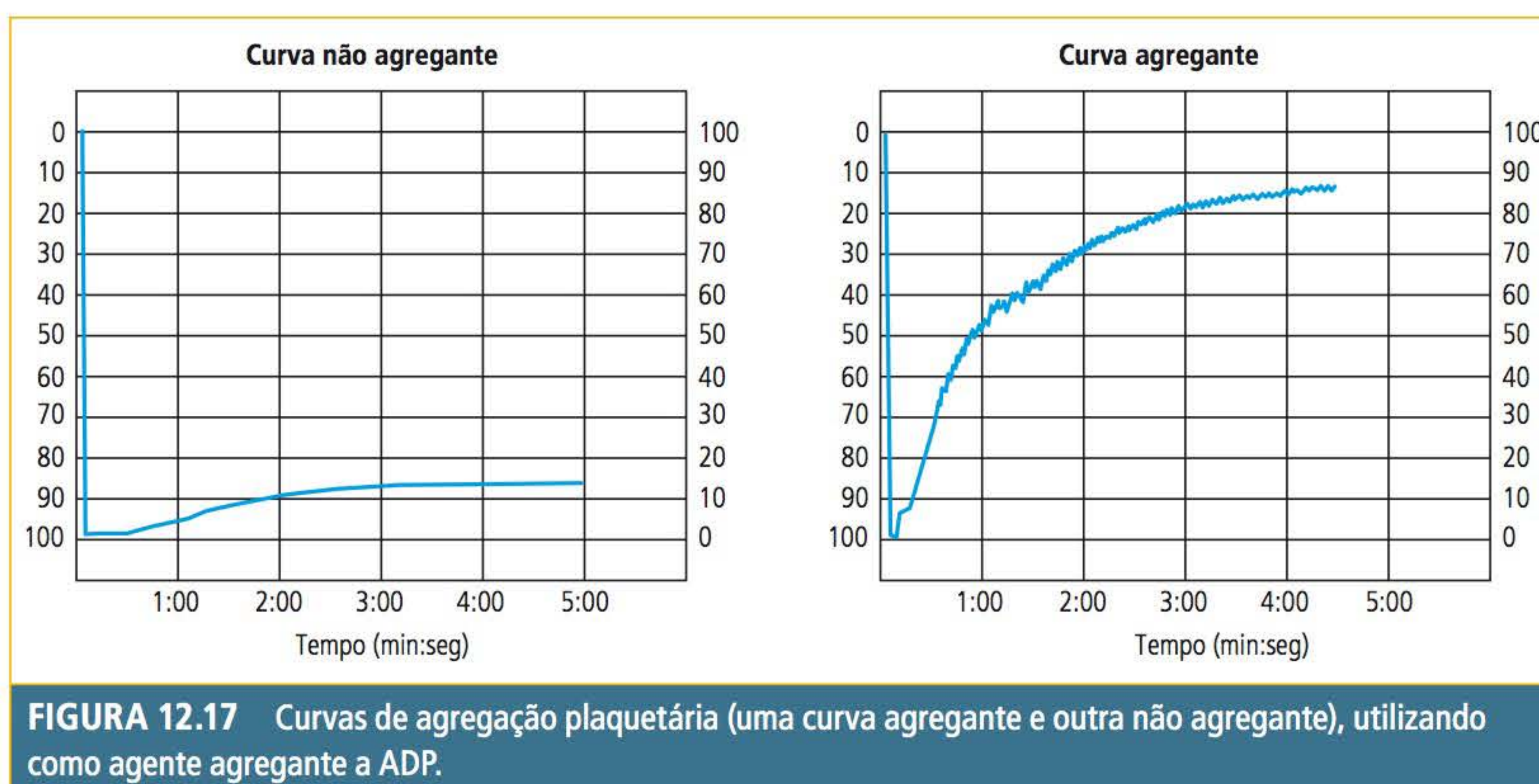
## Agregação plaquetária

Uma técnica pouco utilizada para avaliação funcional das plaquetas e controle de agentes agregantes é a agregação plaquetária. O princípio do teste é simples. Colhe-se o sangue do paciente para obter um plasma rico em plaquetas (as plaquetas estão em suspensão) e coloca-se no agregômetro (aparelho que mede a agregação plaquetária). Pelo tubo onde está o plasma rico em plaquetas, passa um feixe de luz cuja transmitância vai ser medida por uma fotocélula. Quando as plaquetas estão em suspensão, a transmitância é baixa; quando se adiciona o agente agregante, se houver agregação, os grumos plaquetários tendem a sedimentar, e a transmitância aumenta. O aparelho emite uma curva a partir da porcentagem de transmissão de luz pelo tempo transcorrido. A análise da curva permite a avaliação da função plaquetária.<sup>2</sup> Vários são os agentes agregantes utilizados *in vitro*: ADP, adrenalina, colágeno, ácido aracdônico, trombina, ristocetina, epinefrina e plasma bovino.<sup>2</sup> A ADP em baixas concentrações revela uma curva bifásica; a primeira curva é dependente do estímulo da ADP, e a segunda é dependente da secreção plaquetária. Em altas concentrações, mostra uma única curva de agregação. A tromboastenia de Glanzmann e as deficiências de grânulos alfa e corpos densos mostram perfil hipoagregante frente à ADP.<sup>2</sup> A adrenalina induz a secreção pela liberação dos canais de cálcio. Pacientes com deficiência de grânulos alfa e corpos densos não mostram agregação frente à adrenalina.<sup>2</sup> O colágeno liga-se especificamente ao seu receptor (GPIa/IIa, principal receptor) e estimula a secreção plaquetária de forma mais lenta, apresentando uma curva “tardia”. A tromboastenia de Glanzmann não responde com agregação frente ao colágeno.<sup>2</sup> O ácido aracdônico é convertido a tromboxano A<sub>2</sub> por ação da cicloxigenase, mostrando uma única curva de agregação. Pode ser utilizado para o controle do ácido acetilsalicílico e para as deficiências de tromboxano sintetase e cicloxigenase. A trombina é um indutor da agregação plaquetária e mostra uma curva bifásica. Pa-



cientes com tromboastenia de Glanzmann não respondem à trombina.<sup>2</sup> A ristocetina é um antibiótico que deixou de ser utilizado por induzir trombocitopenia em função de seu poder agregante frente ao fator de von Willebrand.<sup>2</sup> É o único agente agregante que não necessita do metabolismo plaquetário; por esse fato, a agregação pode ser realizada em plaquetas formalizadas. A ristocetina é utilizada para diagnóstico da doença de von Willebrand porque a agregação só ocorre na presença desse antibiótico.<sup>2</sup> Pacientes com a síndrome de Bernard-Soulier também não mostram agregação frente à ristocetina.<sup>2</sup> O diagnóstico diferencial pode ser feito pela visualização da morfologia plaquetária e pela utilização de plasma bovino como agente agregante.<sup>2</sup> Na doença de von Willebrand, a agregação é corrigida com plasma bovino e, na síndrome de Bernard Soulier, não. Caso seja adicionado ao plasma do paciente (deficiente de von Willebrand) um plasma normal, a curva de agregação frente à ristocetina é corrigida.<sup>2</sup> Na doença de von Willebrand, a agregação plaquetária é conseguida frente à ADP, adrenalina e ácido aracdônico, mas não frente à ristocetina.<sup>2</sup> A epinefrina mostra uma curva bifásica de agregação com perfil hipoagregante em pacientes tratados com ácido acetilsalicílico e outros agentes inflamatórios.<sup>2</sup> A **Figura 12.17** mostra duas curvas de agregação plaquetária (uma curva agregante e outra não agregante), utilizando como agente agregante a ADP.

Tendo-se um agregômetro, o teste de agregação plaquetária é bastante simples de ser realizado, mas requer muito cuidado na fase pré-analítica. A coleta não pode ser traumática; o sangue deve ser coletado com *scalp*, e os primeiros 3 mL devem ser desprezados. O tubo que receberá o sangue deve ser siliconado ou de plástico. O anticoagulante é o citrato de sódio na proporção de 1 parte de anticoagulante para 9 de sangue, e valores de volume globular abaixo de 20% ou acima de 55% devem ter a quantidade de anticoagulante corrigida (ver fase pré-analítica). O teste deve ser realizado até quatro horas após a coleta, a amostra não pode ser refrigerada, e o teste é realizado a 37 °C. Amostras lipêmicas e hemolisadas interferem na transmitância. O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido por centrifugação (1.000 rpm) em temperatura ambiente, e a quantidade de plaquetas no PRP deve ser padronizada para 250.000/mm.<sup>41</sup> O profissional que realiza a curva de agregação plaquetária deve conversar com o paciente antes da realização do exame. A finalidade dessa conversa é saber se o paciente faz uso de algum medicamento que possa influenciar o resultado do teste e por que foi solicitada a curva de agregação. Saber o motivo da solicitação é muito importante para definir qual agente agregante será utilizado no teste; muitas vezes, para definir uma situação clínica, mais de um agente agregante podem ser utilizados.



**FIGURA 12.17** Curvas de agregação plaquetária (uma curva agregante e outra não agregante), utilizando como agente agregante a ADP.

Fonte: Silva.<sup>42</sup>



A curva de agregação plaquetária deve ser utilizada para monitorar os medicamentos antiagregantes plaquetários, com a finalidade de saber se o medicamento utilizado está inibindo adequadamente a atividade plaquetária. Os medicamentos antiagregantes são discutidos no tópico Controle da terapia antitrombótica do Capítulo 13, Fase pós-analítica: hemostasia secundária.

### Citometria de fluxo

A citometria de fluxo pode ser utilizada para medir a ativação plaquetária e detectar subpopulações plaquetárias.<sup>2</sup> Não é uma metodologia simples e necessita que a fase pré-analítica seja executada com muito critério e por um técnico especializado. Uma dificuldade é que a análise deve ser feita até 45 minutos após a coleta. O método mede a função das plaquetas circulantes; assim, caso haja ativação plaquetária, mas as plaquetas sejam retiradas rapidamente da circulação (p. ex., adesão ao endotélio), a ativação plaquetária não será observada. A citometria de fluxo pode medir a ativação plaquetária, fazer o diagnóstico de disfunções plaquetárias, medir o grau de maturação e reconhecer a presença de anticorpos ligados à membrana plaquetária.<sup>2</sup>

A P-selectina é uma proteína intracelular que está presente na membrana dos grânulos plaquetários quando a plaqueta não está ativada. Com a ativação plaquetária, a membrana do grânulo une-se à membrana citoplasmática, e a P-selectina expressa-se no meio extracelular.<sup>2</sup> Utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-CD62P, que se une especificamente à P-selectina, pode-se quantificar a P-selectina e, com isso, a ativação plaquetária.<sup>2</sup> Podem ser utilizados, também, outros marcadores de ativação plaquetária revelados pelo uso de anticorpos monoclonais anti-CD41 e CD61.<sup>2</sup> Um anticorpo monoclonal chamado PAC-1 reconhece o receptor GPIIb/IIIa quando este está na conformação de alta afinidade; quando há união do receptor com o anticorpo monoclonal, a plaqueta está ativada.<sup>2</sup> Agentes antiagregantes dirigidos contra esse receptor podem ter sua eficácia medida. A tromboastenia de Glanzmann e a síndrome de Bernard-Soulier têm uma expressão reduzida de GPIIb/IIIa e de GPIb/IX/V, e o uso de anticorpos monoclonais dirigidos contra tais receptores pode fazer o diagnóstico dessas patologias.<sup>2</sup> A citometria de fluxo também pode ser utilizada no controle da terapia antitrombótica, e medicamentos como a ticlopidina podem ser avaliados usando a

P-selectina como marcador.<sup>2</sup> A citometria de fluxo também permite identificar a presença de imunoglobulinas na superfície plaquetária em trombocitopenias aloimunes e autoimunes.<sup>2</sup>

### Constantes plaquetárias e plaquetas reticuladas

As constantes plaquetárias e o valor clínico da determinação das plaquetas reticuladas estão descritas no Capítulo 2, Fase analítica – analisadores hematológicos e novos parâmetros derivados da automação.

### REFERÊNCIAS

1. Silva PH, Hashimoto Y. Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária. Rio de Janeiro: Revinter; 2006.
2. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. Hematologia laboratorial. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.
3. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
4. Junqueira L, Carnejo J, Kelley R. Basic histology. 7th ed. Norwalk: Appleton & Lange; 1992.
5. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, et al. Hematology: basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.
6. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology: principles, procedures, correlations. 2nd ed. New York: Lippincott; 1998.
7. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. Annu Rev Med. 1996;47:315-31.
8. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. Cell. 2011;104(4):503-16.
9. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. Acta Anat. 1957;29(3):267-90.
10. Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do eritrograma. São Paulo: Lovise; 1999.
11. Kelemen ECI, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythemic Sera. Acta Haematol. 1958;20:350-5.
12. Lichtmann MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
13. Barry OP, Fitzgerald, GA. Mechanisms of cellular activation by platelets microparticles. Thromb Haemost. 1999;82(2):794-800.
14. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
15. Siljander P, Carpen O, Lassila R. Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. Blood. 1996;87(1):4651-63.
16. Yoneyama A, Nakahara K. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: differentiation from true thrombocytopenia. Nippon Rinsho. 2003;61(4):569-74.
17. Casonato A, Bertomoro A, Pontara E, Dannhauser D, Lazzaro AR, Girolami A. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gplIb-IIIa. J Clin Pathol. 1994;47(7):625-30.



18. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, et al. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell*. 2001;7(2):241-8.
19. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CGM, Rooimans MA, van der Weel L, Steltenpool J, et al. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67(50):1306-8.
20. Silva PH, Hashimoto Y. Interpretação laboratorial do leucograma. São Paulo: Robe; 2003.
21. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*. 1994;78(4):635-44.
22. Bernard J, Soulier JP. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire hémorragique congénitale. *Sem Hop Paris*. 1948;24:3217-23.
23. Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 1998;91(12):4397-418.
24. Taylor CM. Hemolytic-uremic syndrome and complement factor H deficiency: clinical aspects. *Sem Thromb Haemost*. 2001;27(3):185-90.
25. Zipfel PF. Complement factor H: physiology and pathophysiology. *Semin Thromb Hemost*. 2001;27(3):191-9.
26. Torok TJ, Holman RC, Chorba TL. Increasing mortality from thrombotic thrombocytopenic purpura in United States – analysis of national mortality data, 1968 – 1991. *Am J Hematol*. 1995;50(2):84-90.
27. Burrows RF, Kelton JG. Pregnancy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: assessing the risks for the infant at delivery. *Obstet Gynecol Surv*. 1993;46(12):781-8.
28. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, et al. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity; an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1994;84(11):3691-9.
29. Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2000;96(1):188-94.
30. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2003;121(4):535-55.
31. Lichtman MA, Kaushansky K, Kipps TJ, Prchal JT, Levi. *Williams hematology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
32. Kelton JG, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia. Diagnosis, natural history, and treatment options. *Postgrad Med*. 1998;103(2):169-71.
33. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med*. 1995;332(20):1330-5.
34. Hong AP, Cook DJ, Sigouin CS, Warkentin TE. Central venous catheters and upper-extremity deep-vein thrombosis complicating immune heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2003;101(8):3049-51.
35. Kyritsis AP, Williams EC, Schutta HS. Cerebral venous thrombosis due to heparin-induced thrombocytopenia. *Stroke*. 1990;21(10):1503-5.
36. George JN, Raskob GE, Shah SR, Rizvi MA, Hamilton SA, Osborne S, et al. Drug induced thrombocytopenia: a systematic review of published case reports. *Ann Intern Med*. 1998;129(11):886-90.
37. Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, et al. Platelet-active drugs: the relationship among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*. 2011;119(1):39S-63S.
38. Mielke CH Jr. Aspirin prolongation of the template bleeding time: influence of venostasis and direction of incision. *Blood*. 1982;60:1139-42.
39. Comar RS, Danchura HSM, Silva PH. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias e aplicação na rotina laboratorial. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(6):431-6.
40. Mielke CH Jr. Influence of aspirin on platelets and the bleeding time. *Am J Med*. 1983;74:72-8.
41. National Committee for Clinical Laboratories Standards. Procedures for the collections of diagnostic blood specimens by venipuncture. 3rd ed. Villanova: NCCSL; 1991.
42. Silva PH. Aranha marrom e loxoscelismo: revisão bibliográfica e ação sobre os tecidos hematopoiético e renal [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.



DESCRIÇÃO DOS FATORES DA COAGULAÇÃO

Os fatores de coagulação são representados por algarismos romanos. A **Tabela 13.1** relaciona as propriedades de 10 fatores de coagulação. Não estão relacionados, nesse quadro, o fator III (tromboplastina tecidual), os cininogênios de alto peso molecular (HK) e a pré-caliceína (PK).

TABELA 13.1 Propriedades dos fatores de coagulação

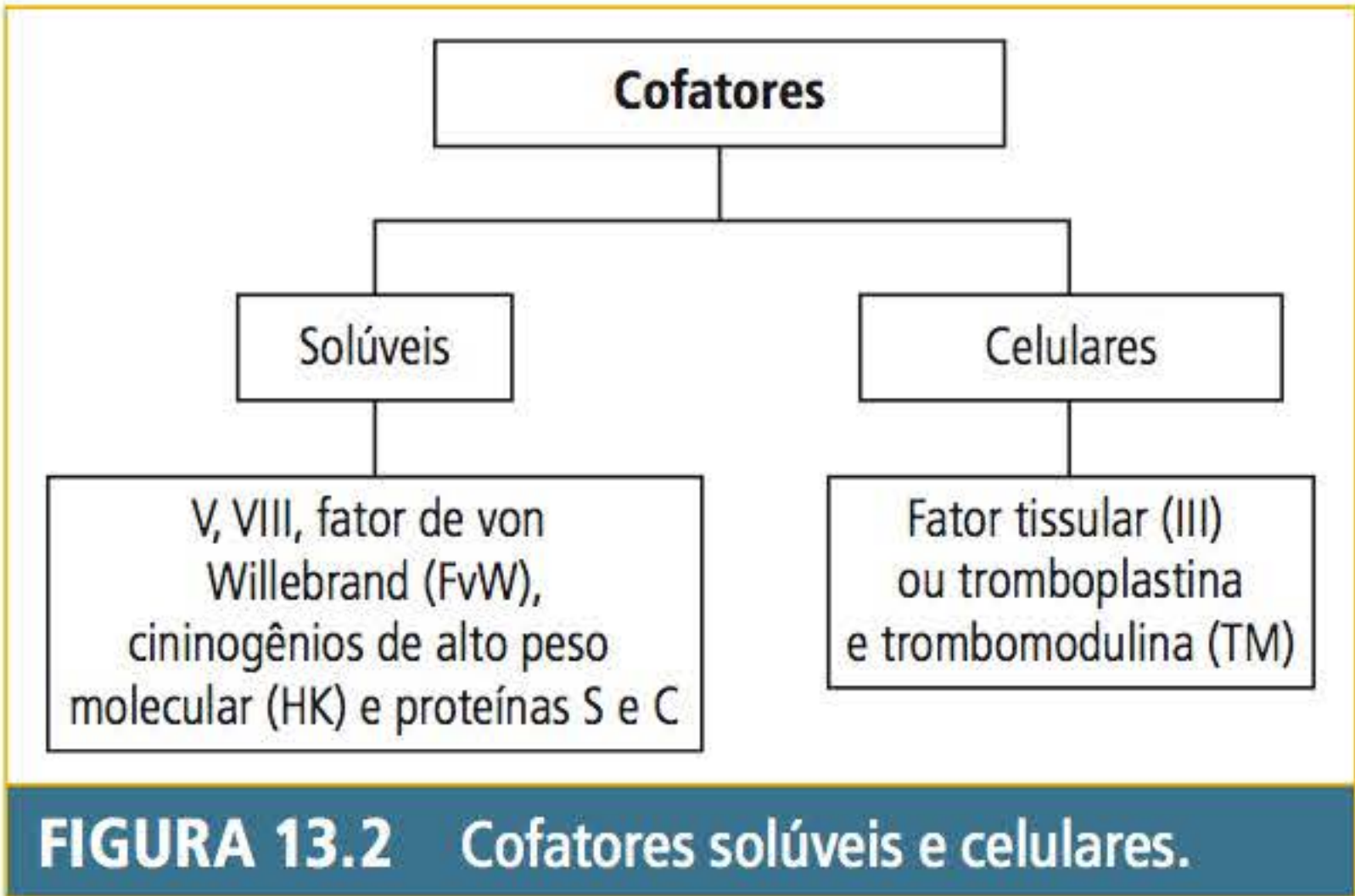
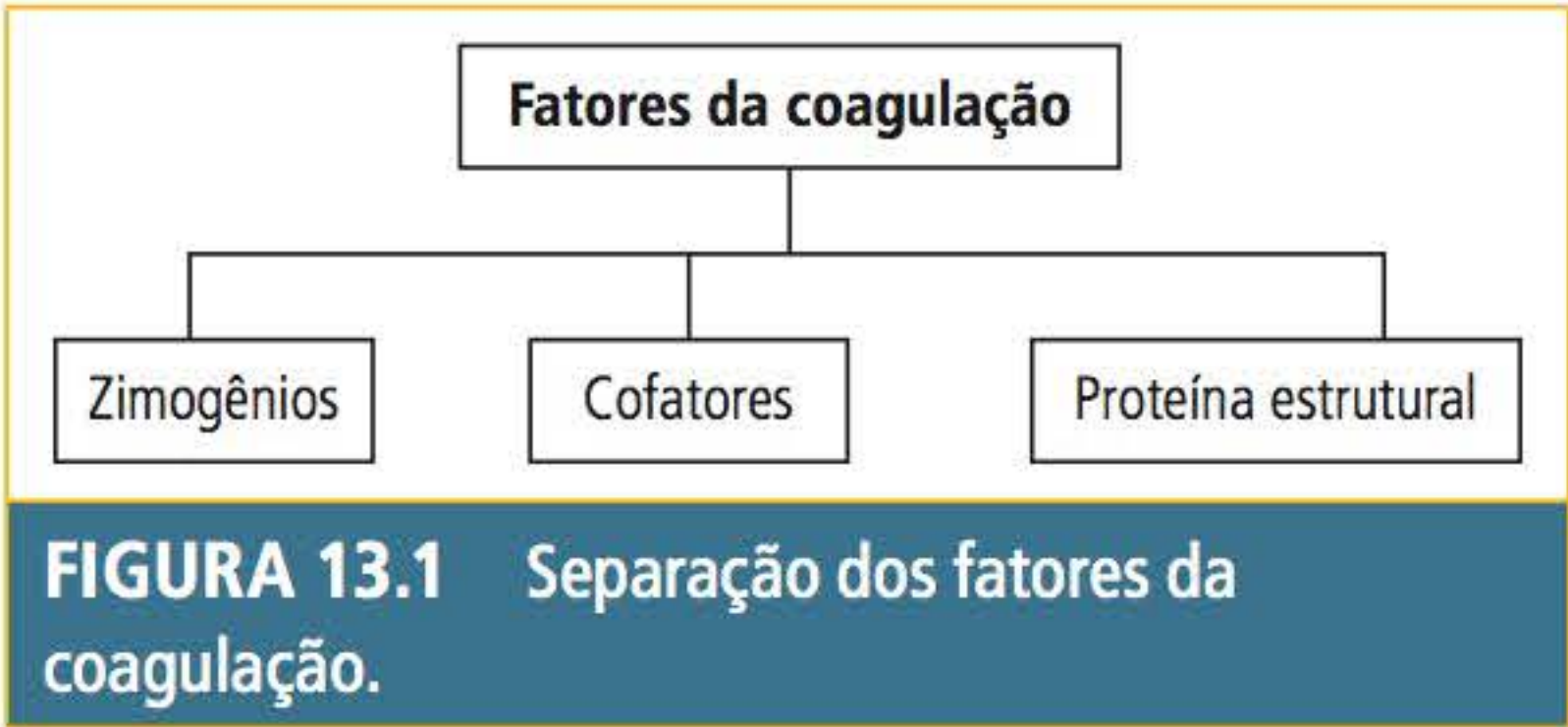
FATOR	LOCAL DE SÍNTESE	MEIA-VIDA EM HORAS	NÍVEL MÍNIMO HEMOSTÁTICO	ESTABILIDADE APÓS COLETA	MODO DE HERANÇA	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA
Fibrinogênio Fator I	Fígado	70-120	50-100 mg/dL	Estável	Autossômica recessiva	4q23-q32
Protrombina Fator II	Fígado	70-110	40% da concentração	Estável	Autossômica recessiva	11
Fator V	Fígado	5	5-10% da concentração	Lábil	Autossômica recessiva	1q21-25
Fator VII	Fígado	4-7	5-10% da concentração	Estável	Autossômica recessiva	13
Fator VIII	Fígado	10-14	30% da concentração	Lábil	Ligada ao sexo	Xq28
Fator IX	Fígado	20	30% da concentração	Estável	Ligada ao sexo	X
Fator X	Fígado	40	8-10% da concentração	Estável	Autossômica recessiva	13q32-qter
Fator XI	Fígado	60	20-30% da concentração	Estável	Autossômica recessiva	4q35
Fator XII	Desconhecido	50-60	Não é requerido	Estável	Autossômica recessiva	5q33-qter
Fator XIII	Fígado	3-12	8-10% da concentração	Estável	Autossômica recessiva	6p24-25 1q31-q32.1

Fonte: Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

Não está relacionada como um fator plasmático da coagulação sanguínea a tromboplastina tecidual, um fosfolipídeo que não está presente na corrente circulatória e que ativa diretamente o fator VII e desencadeia a cascata da coagulação sanguínea por ativar os fatores IX e X. O cálcio ionizado também não está relacionado como um fator da coagulação, mas participa de todas as fases da cascata da coagulação.

Os fatores da coagulação podem ser separados em três categorias: zimogênios, cofatores e proteína estrutural. A **Figura 13.1** traz a separação dos fatores da coagulação em três categorias, e a **Figura 13.2**, os cofatores solúveis e celulares.





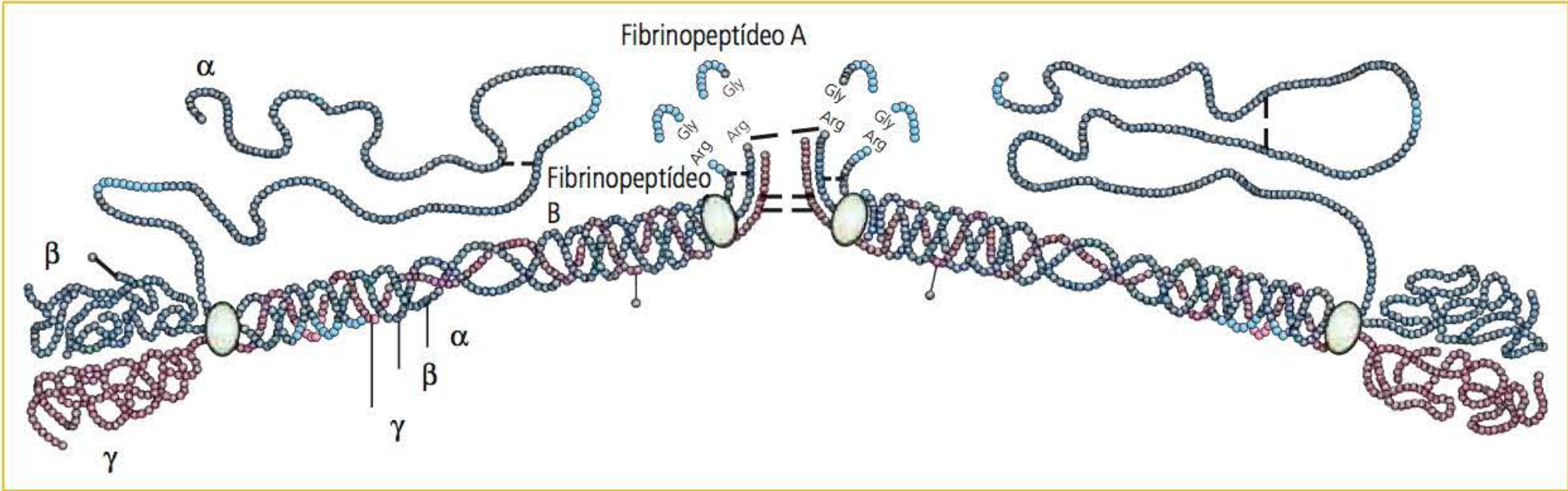
Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

Os zimogênios podem ser definidos como os precursores inertes das serinoproteases e devem ser ativados proteoliticamente para expressarem suas atividades enzimáticas. Isso significa que esses fatores são sintetizados e circulam em uma forma inativa e que devem ser ativados para que possam ativar outros fatores da coagulação.<sup>1</sup> Os zimogênios podem ser divididos em duas classes, os dependentes de vitamina K e os não dependentes de vitamina K. Os fatores II, VII, IX, X, proteína C (PtC) e proteína S (PtS) são dependentes de vitamina K, e os fatores XI, XII, XIII e a pré-caliceína (PK) são não dependentes de vitamina K.

Os cofatores agem em conjunto com os zimogênios e são de extrema importância na cascata

da coagulação sanguínea, porquê, na deficiência de algum cofator, o paciente pode apresentar uma coagulopatia grave. Um exemplo é a hemofilia A, uma coagulopatia bastante grave, causada pela deficiência do fator VIII, que é um cofator. Os cofatores podem ser classificados em solúveis ou celulares. Os solúveis estão no plasma, e os celulares são produzidos a partir de células. Os cofatores solúveis são os fatores V e VIII, o fator de von Willebrand (FvW), os cininogênios de alto peso molecular (HK), a proteína S e a proteína C. Os cofatores celulares são representados pelo fator III (também chamado de tromboplastina tecidual ou fator tissular) e pela trombomodulina (TM). A proteína C, a proteína S e a trombomodulina não participam da ativação da cascata da coagulação; elas agem como inibidores dessa cascata, sendo consideradas os inibidores fisiológicos da coagulação.

A proteína estrutural é representada pelo fibrinogênio, que é chamado de estrutural porque é a partir de sua molécula que o coágulo de fibrina é formado. Quando se visualiza um coágulo formado em um teste de coagulação, por exemplo, quando se realiza um tempo de protrombina (TP) ou tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), este coágulo significa a transformação do fibrinogênio em fibrina, resultado final da cascata da coagulação sanguínea. Deve-se ressaltar que esse coágulo (formação da fibrina *in vitro*) é formado somente pelos fatores da coagulação, não ocorrendo a participação da hemostasia primária. A fibrina é formada pela associação de várias moléculas de fibrinogênio sem os fibrinopeptídeos A e B. A **Figura 13.3** traz uma representação da molécula do fibrinogênio.



**FIGURA 13.3** Representação da molécula do fibrinogênio.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>



ZIMOGÊNIOS

FATORES DEPENDENTES DE VITAMINA K  
Ciclo da vitamina K

Os fatores dependentes de vitamina K são o II, VII, IX e X. Esses fatores são sintetizados no fígado e, para se tornarem ativos, ou seja, passíveis de serem ativados por outros fatores, eles devem ser carboxilados nos seus resíduos de ácido glutâmico; essa carboxilação é dependente da vitamina K.<sup>1</sup> A vitamina K realiza um ciclo de oxirredução, em que ela é reduzida à forma de hidroquinona e, nessa estrutura, cede o radical carboxila para os fatores da coagulação (dependentes de vitamina K) e retorna a sua forma oxidada.<sup>1</sup> A enzima NADPH redutase é responsável pela redução da vitamina K (forma de hidroquinona), e a enzima vitamina K carboxilase (γ-glutamil carboxilase) oxida a vitamina K.<sup>1</sup> Ocorrendo a carboxilação, o pró-peptídeo (parte da estrutura molecular do fator de coagulação) é clivado, e a proteína madura é secretada.<sup>1,2</sup> Os anticoagulantes orais (varfarina e dicumarol) inibem o ciclo da vitamina K da forma oxidada para

a reduzida; desse modo, não há ativação dos fatores II, VII, IX e X, e o paciente fica anticoagulado. A Figura 13.4 ilustra o ciclo da vitamina K, e a Figura 13.5 mostra a estrutura molecular dos fatores dependentes de vitamina K.

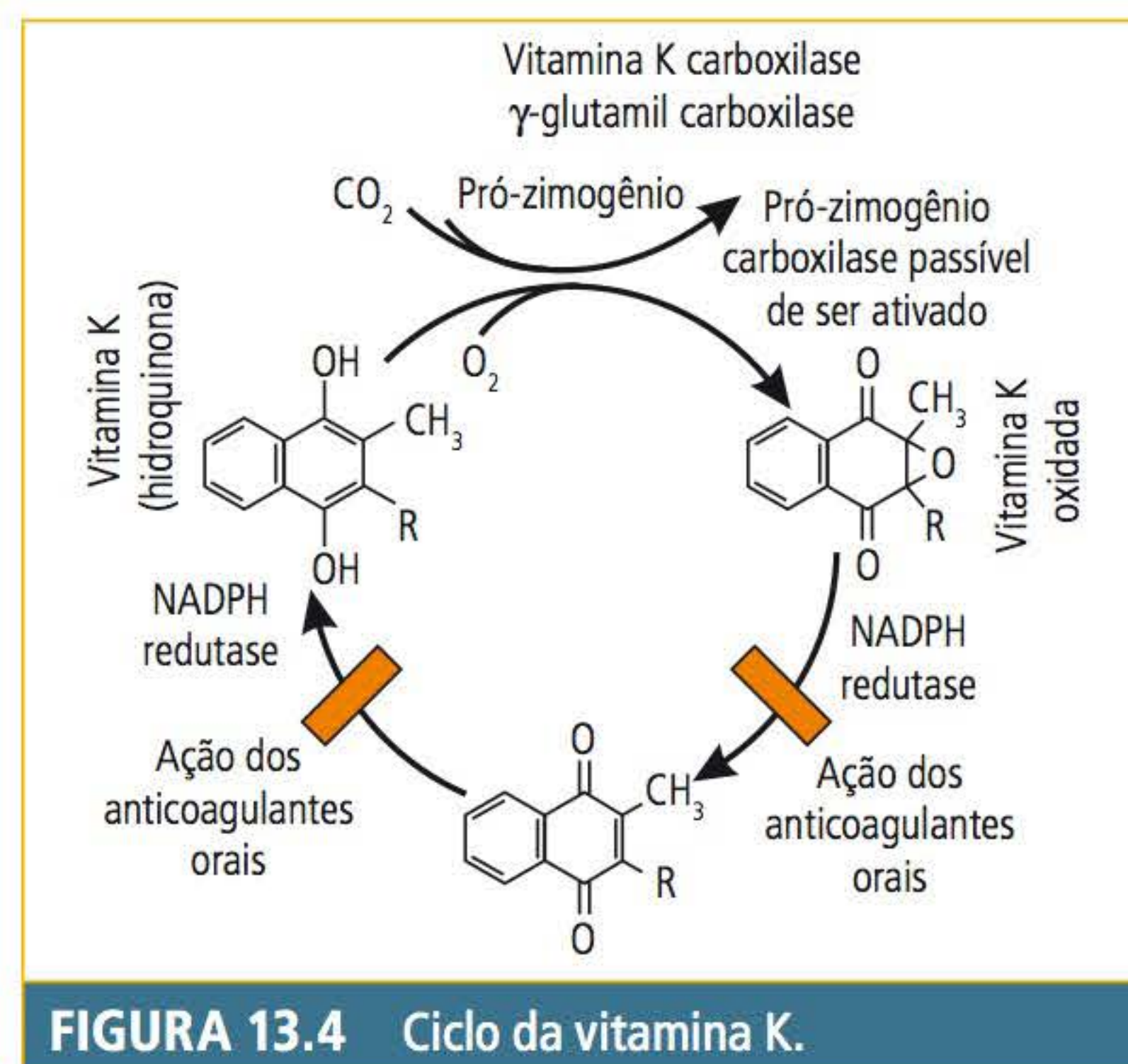


FIGURA 13.4 Ciclo da vitamina K.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

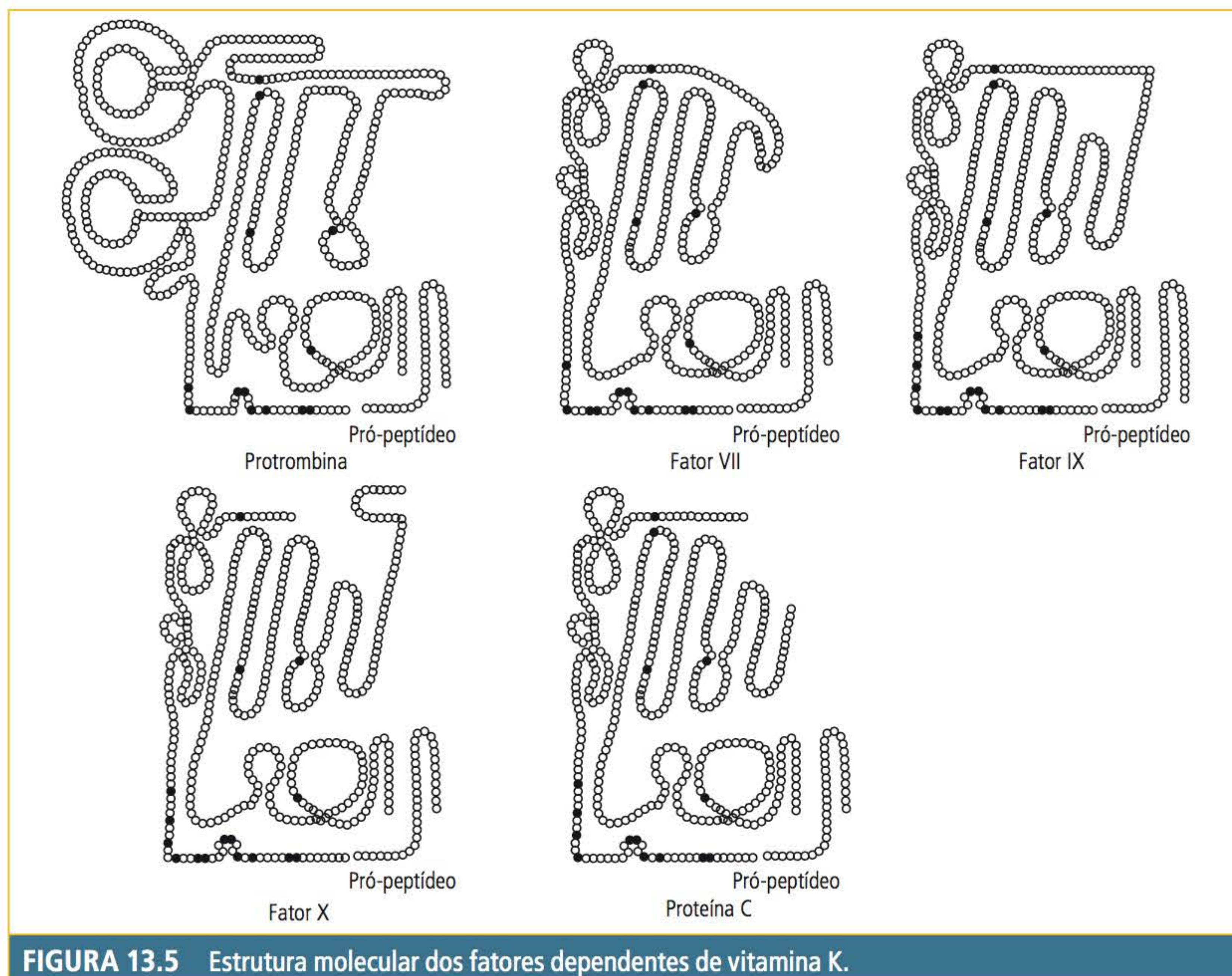


FIGURA 13.5 Estrutura molecular dos fatores dependentes de vitamina K.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>



A estrutura molecular dos fatores dependentes de vitamina K é muito semelhante. Todas possuem de 9 a 12 resíduos aminoterminais de ácido glutâmico e uma sequência aminoterminal de 19 a 25 aminoácidos, chamados de pró-peptídeos, que reconhecem a enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase, que catalisa a carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico.<sup>1</sup> Quando ocorre a carboxilação, o pró-peptídeo é clivado, e a proteína madura (fatores II, VII, IX e X) é secretada. A estrutura gênica desses fatores é muito semelhante: a variação ocorre no tamanho dos íntrons.<sup>1</sup> Mutações na enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase podem resultar em baixos níveis desses fatores em pessoas portadoras destas mutações. Esta situação é muito interessante e chama a atenção para o fato de, antes de se iniciar uma terapia com anticoagulantes orais convencionais, deve-se, obrigatoriamente, realizar um TP (tempo de protrombina, anteriormente designado como TAP – tempo de atividade da protrombina) basal. O TP é o teste de escolha porque ele é dependente, exclusivamente, do fator VII, e a inibição do fator VII reflete o nível de anticoagulação pelo anticoagulante oral convencional.

### Fator II

Também é chamado de protrombina ou forma inativa da trombina, ou seja, é um precursor da trombina. É uma glicoproteína (579 aminoácidos) de síntese hepática e cerebral, cujo gene está localizado no cromossomo 11 e possui 14 éxons e 13 íntrons.<sup>1,2</sup> A protrombina não tem atividade coagulante na forma de zimogênio e deve ser transformada em trombina para apresentar atividade coagulante.<sup>1</sup>

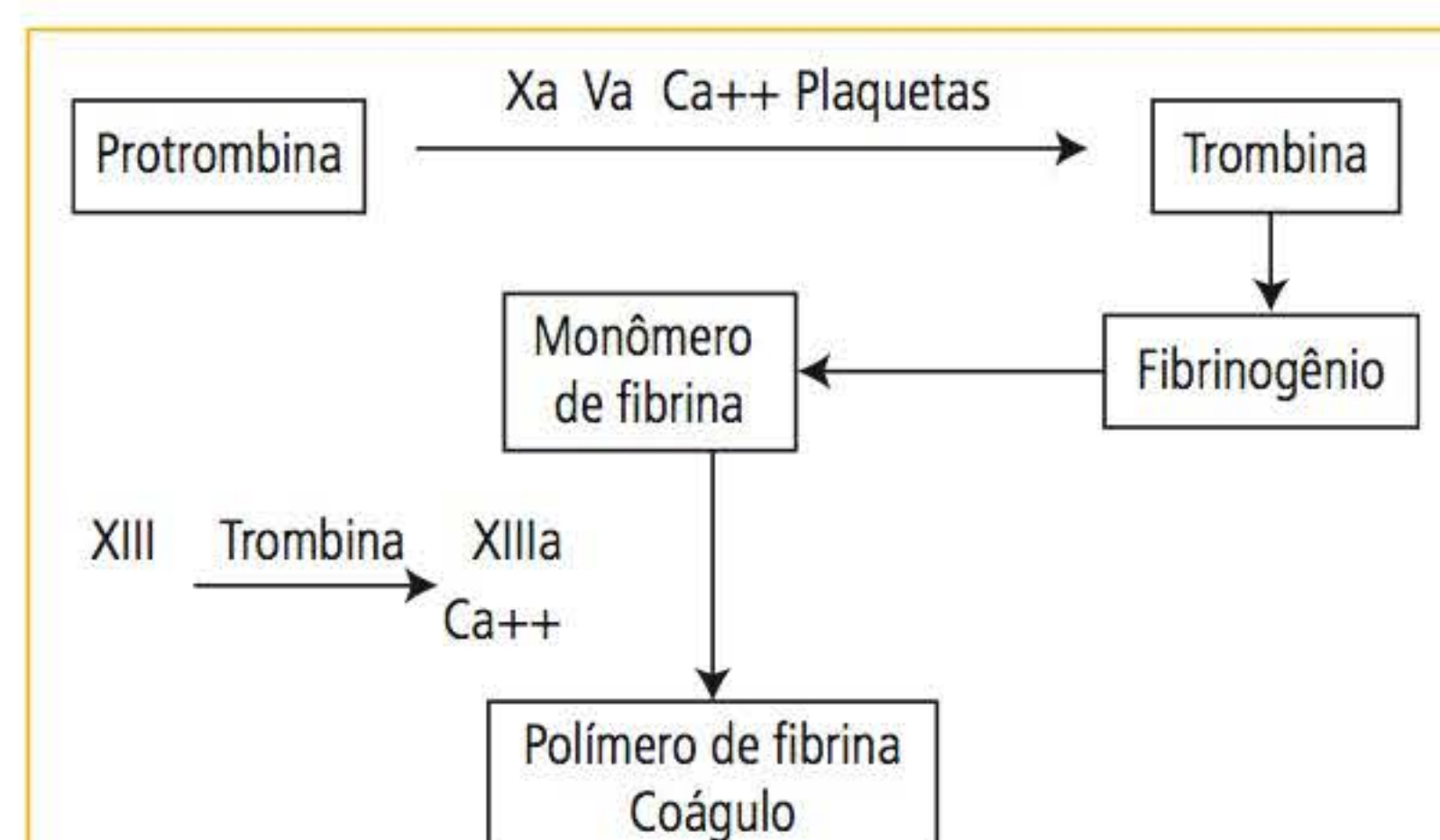
A protrombina passa à forma ativa (trombina) por ação do complexo dos fatores Xa, Va, íons cálcio e fosfolípídeo plaquetário, o qual cliva o sítio catalítico da molécula da protrombina entre os aminoácidos arginina-320 e isoleucina-321, formando um composto intermediário chamado de meizotrombina.<sup>1</sup> A clivagem na meizotrombina, entre arginina-271 e treonina-272, gera dois fragmentos, o  $\alpha$ -trombina e o fragmento 1+2.<sup>1</sup> A clivagem entre arginina-155 e serina-156 tanto na meizotrombina como no fragmento 1+2 irá gerar a trombina.<sup>1</sup>

A trombina apresenta duas ações na hemostasia, a primeira é pró-coagulante, e a segunda é anticoagulante. A função pró-coagulante revela-se pela atividade fibrinolítica (transforma o

fibrinogênio em fibrina), pela ativação dos fatores V, VIII, XI, XIII, pela ativação das plaquetas e pela secreção do fator von Willebrand.<sup>1</sup> Sua ação anticoagulante está no fato de ela limitar a formação do coágulo no local da lesão, ao estimular o endotélio a sintetizar e liberar substâncias que inibem as plaquetas, que causam vasodilatação e liberam ativadores teciduais do plasminogênio.<sup>1</sup> A trombina, ainda em ação anticoagulante, faz com que a célula endotelial expresse, em sua superfície, a trombomodulina (cofator da trombina), e o complexo proteína C-S (inibidor fisiológico da coagulação) é ativado. A afinidade do complexo trombina-trombomodulina pela proteína C pode aumentar significativamente sob a ação do receptor endotelial da proteína C.<sup>1</sup> A trombina apresenta atividade de fator de crescimento e citocina com função na aterosclerose, cicatrização e inflamação.<sup>1</sup> É inibida pela antitrombina e pela heparina cofator II.<sup>1</sup>

Não há descrição de deficiências graves da protrombina por serem incompatíveis com a vida. Disprotrombinemias são raras. São descritos polimorfismos da protrombina que acarretam aumento na sua concentração e, com isso, um risco aumentado de trombose. Uma mutação de ponto na posição 20210, em que ocorre a troca de uma guanina por adenina, resulta em um aumento de 30% na concentração da protrombina.<sup>1</sup> A concentração plasmática de protrombina é de aproximadamente 100  $\mu\text{g/mL}$  e com tempo de meia-vida de aproximadamente três dias.<sup>2</sup>

A ativação da protrombina marca o início da via comum. A **Figura 13.6** mostra a sequência de ativação dos fatores de coagulação a partir da protrombina.



**FIGURA 13.6** Ativação dos fatores de coagulação a partir da protrombina.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>



## Fator VII

O gene do fator VII está localizado no cromossomo 13, possui 8 éxons e 7 íntrons e 12,8 Kb e produz uma glicoproteína de 406 aminoácidos.<sup>1,2</sup> Sua síntese é hepática.<sup>1</sup> O fator VII circula em duas formas no plasma: na forma inativa (zimogênio inativo) e na forma ativada (VIIa, encontrada em baixa concentração).<sup>2</sup> O fator VIIa tem uma concentração que é suficiente para ativar o fator X (Xa) na presença do fator tissular.<sup>2</sup> O fator Xa ativa o fator VII inativado, e o complexo fator VIIa-fator tissular ativa, também, o fator VII.<sup>2</sup>

O fator VII, quando ativado, ativa o X e desencadeia a transformação da protrombina em trombina. Atualmente, sabe-se que o fator VII também ativa o fator IX que, associado ao VIII, a plaquetas e ao cálcio, ativa o X. O fator VII passa a ter um papel central na coagulação sanguínea por ativar tanto o fator X como o IX. Em termos de coagulação sanguínea, o organismo somente deve tolerar a presença do fator tissular em situações fisiológicas pró-coagulantes.

A deficiência de fator VII é rara, mas está associada à doença hemorrágica.<sup>1</sup>

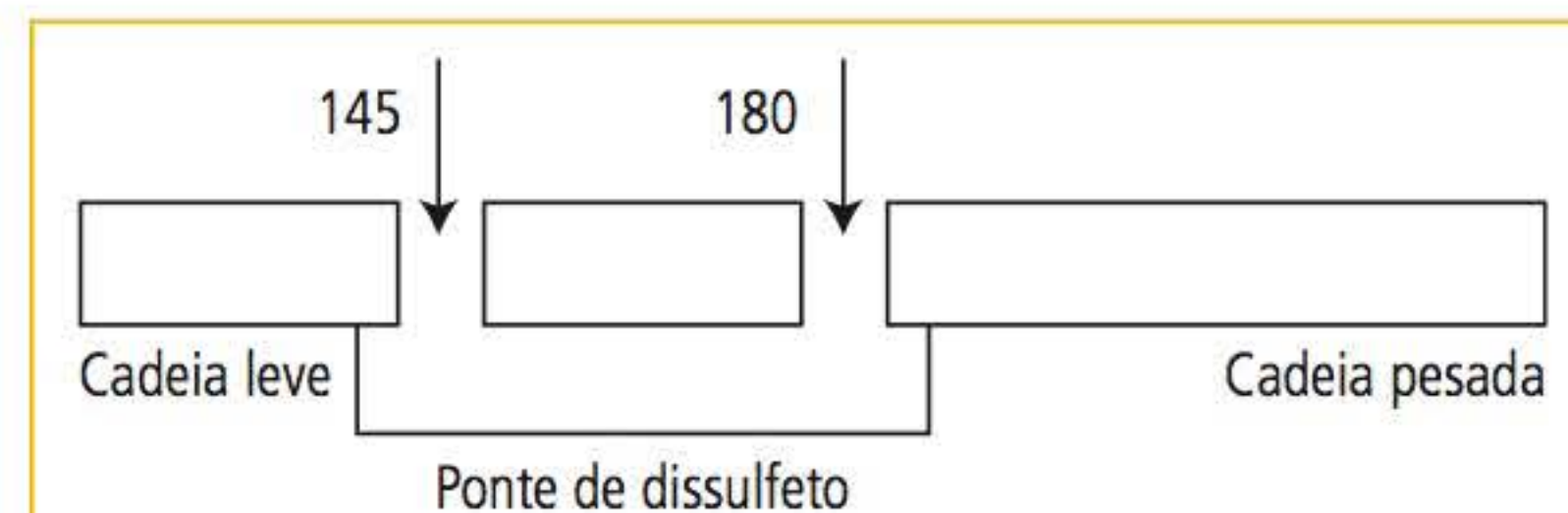
## Fator IX

O gene do fator IX está localizado no braço longo do cromossomo X (especificamente em Xq27.1);<sup>2</sup> portanto, a sua deficiência é uma herança ligada ao sexo. O fator IX é uma glicoproteína de cadeia única composta de 415 aminoácidos com um peso molecular de 56kDa.<sup>2</sup>

O fator IX é ativado principalmente pelo fator VII ativado, mas pode ser ativado também pelo fator XI ativado. Tem como cofator o VIII ativado, que se complexa ao IX ativado sobre a superfície plaquetária, e este complexo, na presença de íons cálcio, ativa o fator X. Há uma redução bastante significativa na ativação do fator IX em pacientes com deficiência de fator VII, e o contrário não ocorre. Tais observações corroboram o entendimento de que a cascata da coagulação inicia pela ativação do fator VII pelo fator tissular.<sup>2</sup>

A ativação do fator IX significa a clivagem em dois pontos da molécula: uma clivagem ocorre entre a arginina-145 e a alanina-146,<sup>2</sup> e a outra é entre a arginina-180 e a valina-181.<sup>2</sup> Após as duas clivagens, o fragmento entre a alanina-146 e a valina-181 é retirado da molécula; os dois fragmentos restantes são unidos por uma ponte de dissulfeto e representam o fator IX ativado com duas cadeias:

a cadeia leve (com 17 kDa)<sup>2</sup> e a cadeia pesada (com 28 kDa).<sup>2</sup> A **Figura 13.7** esquematiza a ativação do fator IX.<sup>2</sup>

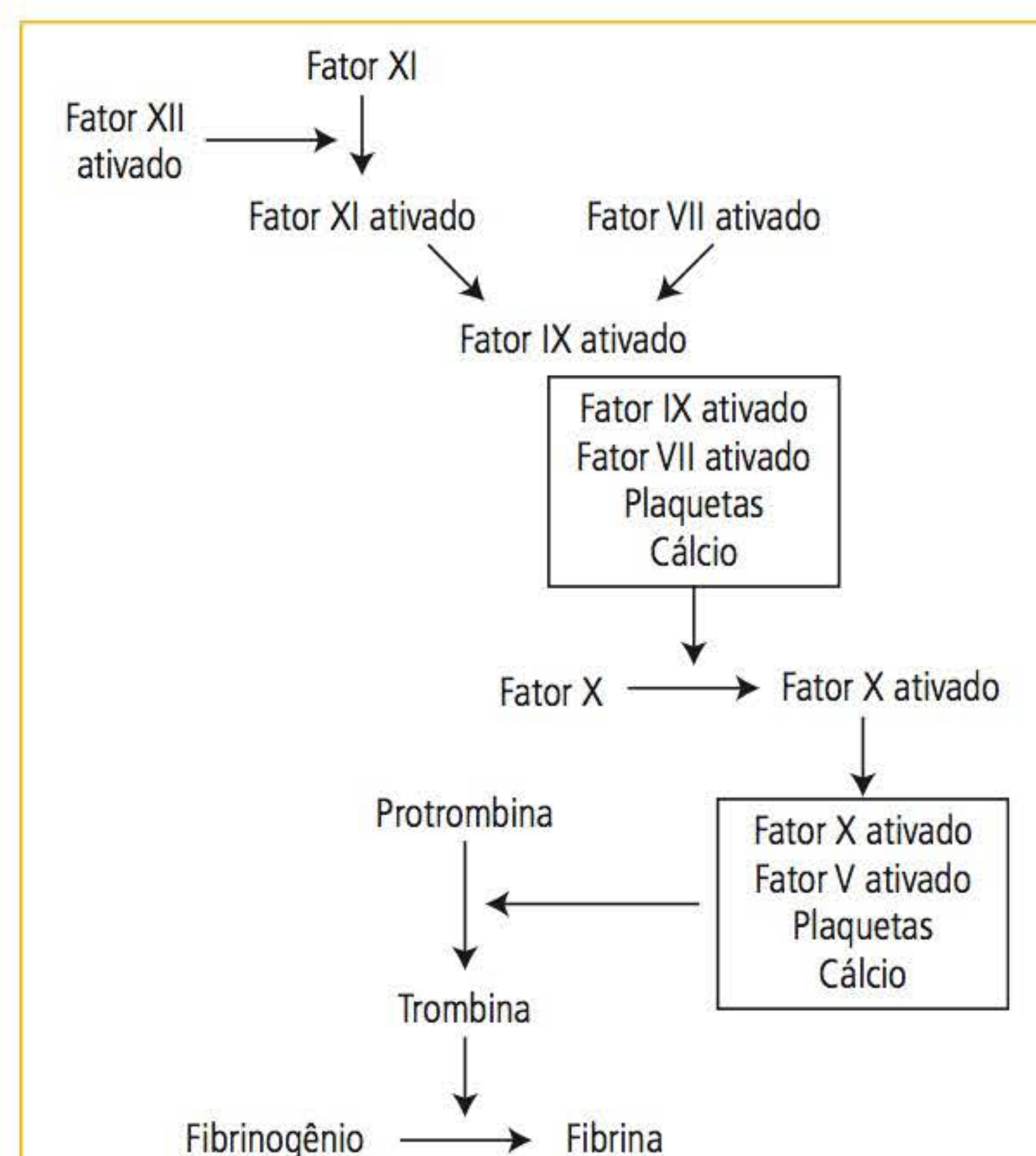


**FIGURA 13.7** Representação da ativação do fator IX.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

A ativação do fator IX é dependente de cálcio, que acelera a ativação do fator IX. A cadeia leve é responsável pela atividade proteolítica do fator IX ativado, e a cadeia pesada é responsável pela aceleração da ativação do fator IX pelo cálcio.<sup>2</sup>

A concentração plasmática do fator IX é de aproximadamente 5 µg/mL e com tempo de meia-vida de cerca de 24 horas.<sup>2</sup> A **Figura 13.8** mostra a sequência de ativação da cascata da coagulação a partir da ativação do fator IX.



**FIGURA 13.8** Sequência de ativação da cascata da coagulação a partir da ativação do fator IX.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

## Fator X

O fator X é uma glicoproteína cujo gene está localizado no cromossomo 13 e possui 25 Kb com 8 éxons e 7 íntrons.<sup>1,2</sup> A ativação do fator X marca o



início da ativação da protrombina: ele é ativado pelo fator VII ativado e pelo complexo do fator IX ativado com o VIII.<sup>1</sup> O fator X ativado complexa-se ao fator V ativado sobre a superfície plaquetária, na presença de íons cálcio, e transforma a protrombina em trombina. Apresenta atividade anti-inflamatória e é mitogênico para células musculares.<sup>1</sup> A deficiência do fator X é rara.<sup>1</sup> A concentração plasmática do fator X é de aproximadamente 10 µg/mL, e o tempo de meia-vida é de cerca de 36 horas.<sup>2</sup>

## ■ FATORES NÃO DEPENDENTES DE VITAMINA K

### Fator XI

O fator XI é uma glicoproteína que se forma por duas cadeias polipeptídicas, com um total de 607 aminoácidos, constituído de 4 subunidades chamadas de domínio *apple*, que são as ligações para HK (cininogênios de alto peso molecular), plaquetas, fator IX, trombina e fator XII.<sup>1</sup>

O gene do fator XI está localizado no cromossomo 4, possui 23 Kb com 15 éxons e 14 íntrons.<sup>1,2</sup> Pertence à fase contato da cascata da coagulação, que se inicia pela ativação do fator XII. A ativação do fator XI pode-se dar via XII ativado e via trombina. O fator XI ativado ativa o fator IX. Sua deficiência está associada com processos hemorrágicos em situações específicas, como em extrações dentárias.<sup>1</sup> A concentração plasmática do fator XI é de 5 µg/mL, e o tempo de meia-vida, em torno de três dias.<sup>2</sup>

### Fator XII

O fator XII é sintetizado no cromossomo 5, possui 14 éxons e 13 íntrons<sup>1,2</sup> e é uma glicoproteína com 596 aminoácidos.<sup>2</sup> É chamado de fator contato por ser ativado por substâncias estranhas ao sangue circulante, por exemplo, o vidro, os reagentes utilizados no TTPa (cefalina + ativador dos fatores da coagulação) e o subendotélio exposto.<sup>2</sup> *In vivo* é ativado pela exposição do subendotélio e não desempenha um papel primordial na ativação da cascata da coagulação sanguínea, porque a deficiência do fator XII não está associada a nenhuma doença hemorrágica.<sup>2</sup> O fator XII não é primordial na ativação da cascata da coagulação, mas tem funções biológicas importantes: inicia a ativação do sistema fibrinolítico, ativa a cascata do complemento (a partir da ativação de C1) e é um mediador da resposta inflamatória.<sup>1</sup>

Aumenta a produção de interleucina-1 (IL-1) por células mononucleares e de interleucina-6 (IL-6) por neutrófilos.<sup>1</sup> O fator XII é ativado por endotoxinas bacterianas, mas não é responsável pelo desenvolvimento da coagulação intravascular disseminada.<sup>1</sup>

A interleucina-1 tem sua produção estimulada por produtos bacterianos (endotoxinas), células mortas, vírus, interferon e imunocomplexos, além do estímulo via fator XII.<sup>1</sup> Ela é produzida por macrófagos, células dendríticas e fibroblastos.<sup>1</sup> O receptor celular para a IL-1 é o CD121b, uma glicoproteína com gene localizado no cromossomo 2q12.<sup>1</sup> A IL-1 foi inicialmente chamada de pirogênio endógeno, até a descoberta da existência de mais três pirogênios endógenos: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Tem a propriedade de elevar a temperatura corporal e ativar células endoteliais, aumentando, nessas células, a expressão de proteínas adesivas e promovendo a adesão do neutrófilo a ela.<sup>1</sup> Além de ativar as células endoteliais, promove a sua contração, para tornar possível a diapedese leucocitária; portanto, participa da reorganização do citoesqueleto.<sup>1</sup> A IL-1 regula, também, o sistema imune, aumenta a concentração de proteínas de fase aguda e está envolvida com o reparo tecidual, pois é mitogênica e quimiotática para fibroblastos e estimula a síntese de colágeno e collagenases pelos fibroblastos.<sup>1</sup> Ativa o linfócito T promovendo sua proliferação em resposta a um determinado antígeno e causa neutrofilia por fazer a desmarginação dos neutrófilos.<sup>1</sup> Os monócitos e os macrófagos têm uma participação fundamental na hemostasia, porque também secretam ativadores do plasminogênio, inibidores da plasmina, fator de ativação de plaquetas e fosfolípídeo tecidual.<sup>1</sup> Secretam ainda fatores estimulantes de colônias de granulócitos e monócitos, os quais promovem a proliferação de neutrófilos e monócitos.<sup>1</sup>

A IL-6 é uma glicoproteína de 20 a 30 kDa com 212 aminoácidos produzida por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos T e B, cujo gene está localizado no cromossomo 7.<sup>1</sup> Também é considerada um pirogênio endógeno.<sup>1</sup> O receptor da IL-6 é o CD126, presente em células hematopoiéticas, células do tecido conectivo, hepatócitos e células neurais.<sup>1</sup> A IL-6 está envolvida com a diferenciação final das células B (secreção de imunoglobulinas), a proliferação de linfócitos B,



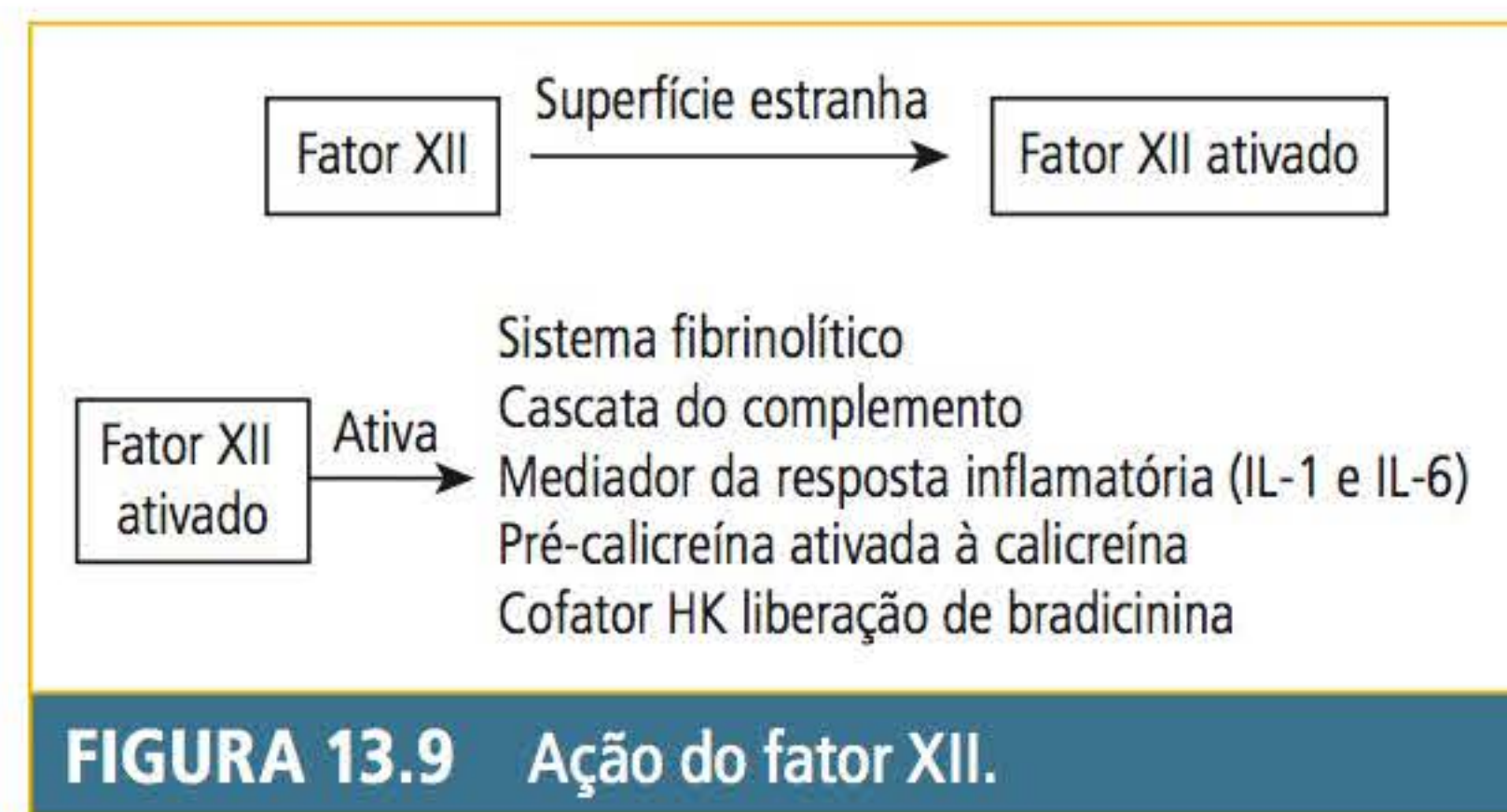
plasmócitos e células do mieloma, estimula a produção de plaquetas, aumenta a secreção das proteínas de fase aguda pelo hepatócito (aumenta em mil vezes a concentração da proteína C reativa e aumenta a concentração do fibrinogênio e da  $\alpha$ -1-antitripsina) e participa da diferenciação de células T e macrófagos.<sup>3</sup> Níveis elevados de IL-6 estão associados com processos infecciosos bacterianos, doenças autoimunes, inflamações/infeções pós-cirúrgicas e neoplasias.<sup>1</sup>

A fase contato da coagulação sanguínea, além do fator XII, tem a participação da pré-caliceína (PK) e dos cininogênios de alto peso molecular (HK). Quando ocorre a exposição do colágeno (subendotélio), o fator XII liga-se ao cininogênio de alto peso molecular e, desse modo, torna-se ativado, transformando a pré-caliceína em caliceína e ativando o fator XI, que também é um ativador do fator IX. O TTPa tem sua ativação a partir do fator XII e se altera na deficiência de PK e HK, fatores muitas vezes esquecidos quando se tem alteração do TTPa.

A PK é sintetizada no cromossomo 4, tem 15 éxons, 4 domínios *apple* e apresenta grande homologia com o fator XI.<sup>1</sup> Torna-se ativada pela ação do fator XII ativado, formando a caliceína, que também está envolvida com a ativação do sistema fibrinolítico.<sup>1</sup> Os HKs tem 11 éxons, são sintetizados no cromossomo 3 e são considerados cofatores porque circulam complexados com o fator XII e a PK e liberam a bradicinina, que é um potente vasodilatador.<sup>1</sup> A fase contato é responsável pela ativação da coagulação *in vitro*. É necessária para um TTPa normal, mas não é necessária para uma hemostasia normal; portanto, a deficiência destes fatores (XII, XI, PK e HK) não está correlacionada com hemorragia, mesmo após cirurgia ou trauma intenso. A única exceção é para o fator XI; em determinadas situações, na sua deficiência, ocorre hemorragia (ver deficiência do fator XI). A concentração plasmática do fator XII é de aproximadamente 30  $\mu\text{g/mL}$ , e o tempo de meia-vida é de cerca de dois dias.<sup>2</sup> A **Figura 13.9** mostra a ação do fator XII.

### Fator XIII

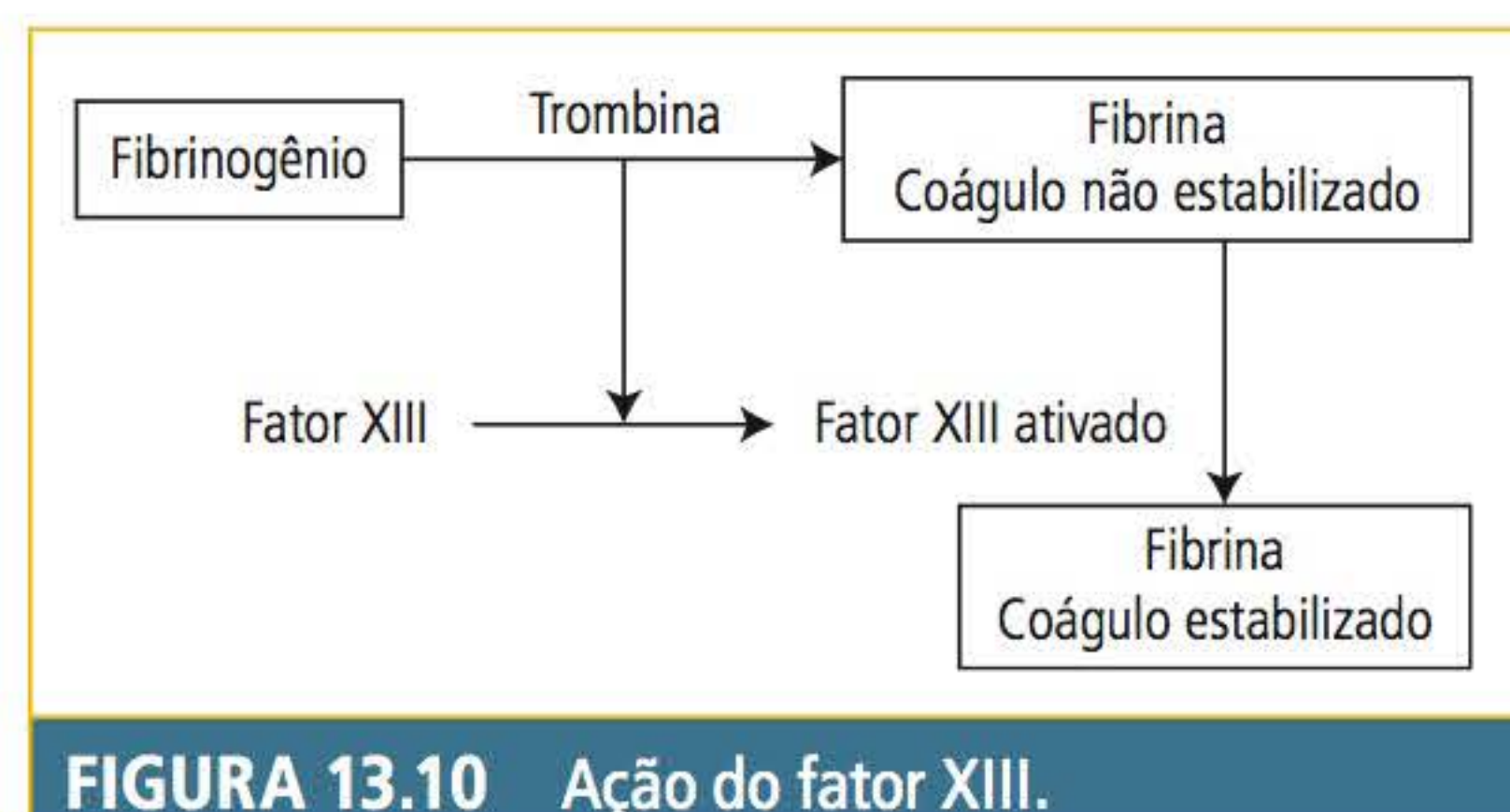
É uma glicoproteína constituída de duas subunidades, chamadas de subunidade A e subunidade B.<sup>2</sup> O gene que sintetiza a subunidade A está localizado no cromossomo 6 e possui 15 éxons e 14 íntrons.<sup>1</sup>



**FIGURA 13.9** Ação do fator XII.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

O gene que sintetiza a subunidade B está localizado no cromossomo 1 e possui 12 éxons e 11 íntrons.<sup>1</sup> A subunidade B é um transportador de proteína, e a subunidade A apresenta atividade enzimática.<sup>1</sup> Além do plasma, o fator XIII é encontrado em plaquetas, monócitos e macrófagos.<sup>1</sup> O fator XIII plaquetário somente expressa a cadeia A e representa 50% do fator XIII ativado, é expresso na superfície plaquetária e une essa superfície à rede de fibrina.<sup>1</sup> Sua função fisiológica é fazer ligações cruzadas entre as cadeias  $\alpha$  (alfa) e  $\gamma$  (gama) do fibrinogênio, com a finalidade de estabilizar o coágulo de fibrina. Ele faz a ligação covalente entre um resíduo de glutamina, de uma molécula de fibrina, com um resíduo de lisina, de outra molécula de fibrina; tal ligação é dependente de cálcio e libera amônia.<sup>1</sup> São ligações covalentes intermoleculares que conferem estabilidade e previnem a proteólise da molécula de fibrina. O fator XIII circula em associação com o fibrinogênio, sendo ativado pela presença da trombina. Na deficiência do fator XIII, o coágulo formado é inadequado para a coagulação sanguínea. Em um primeiro momento, ocorre a coagulação, mas, posteriormente, pela não estabilização da rede de fibrina, o paciente volta a sangrar (ver deficiência do fator XIII). A **Figura 13.10** mostra a ação do fator XIII.



**FIGURA 13.10** Ação do fator XIII.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>



## COFADORES SOLÚVEIS

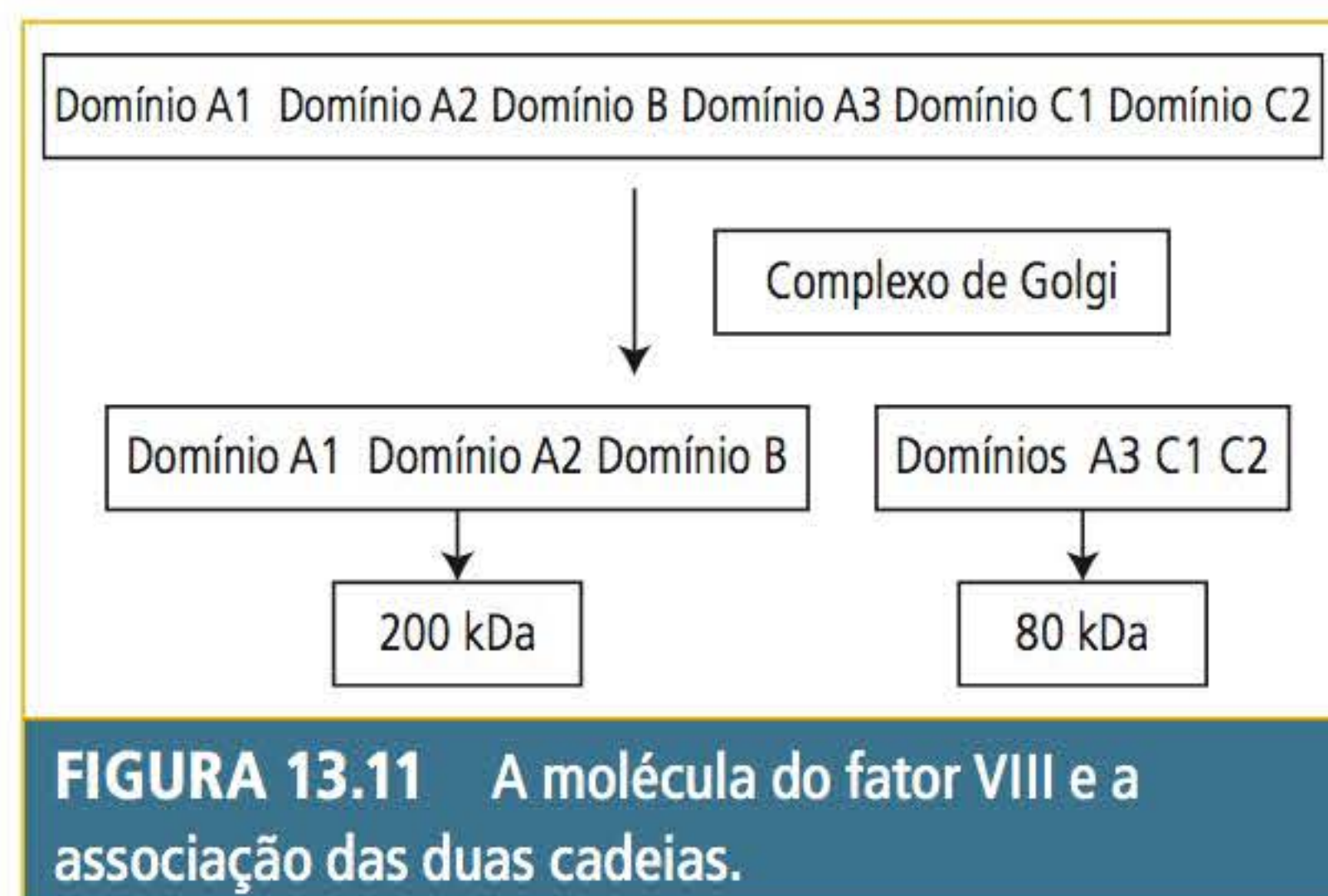
### ⚡ FATOR V

O fator V é uma glicoproteína cujo gene está localizado no cromossomo 1 e possui 25 éxons e 24 íntrons.<sup>1,2</sup> Cerca de 20% do fator V circulante é produzido pelos grânulos alfa das plaquetas;<sup>2</sup> seu ativador primário é a trombina, mas também pode ser ativado pelo fator X ativado.<sup>1</sup> A ativação do fator V significa clivagens nos resíduos de aminoácidos na posição 709, 1018 e 1545.<sup>1</sup>

É inativado pelo complexo proteína C–proteína S, que cliva a molécula nos resíduos de posição 306 e 506. Mutações na molécula do fator V, especificamente, no aminoácido arginina (posição 506), conferem a resistência ao complexo proteína C–proteína S, mutação conhecida como fator V de Leiden, que afeta 5% da população branca e confere um estado de hipercoagulabilidade primário.<sup>1</sup> Em estado heterozigoto, aumenta em oito vezes a probabilidade de trombose; como homozigoto, o risco de trombose fica em torno de cem vezes o da população em geral.<sup>1</sup>

### ⚡ FATOR VIII

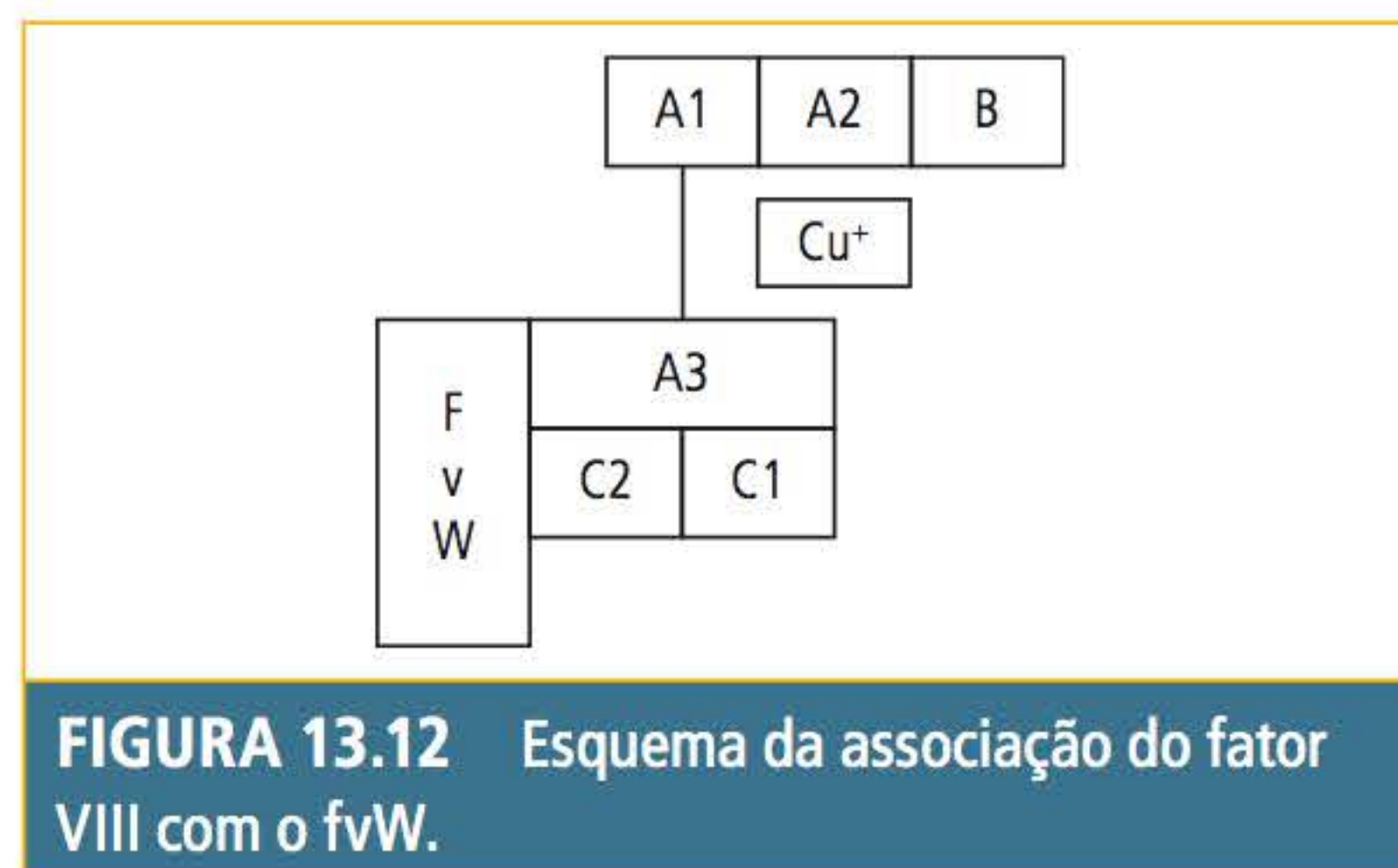
O fator VIII é uma glicoproteína com 2.332 aminoácidos,<sup>2</sup> seu gene está localizado no cromossomo X (Xq28), possui 26 éxons e 25 íntrons; portanto, é uma herança ligada ao sexo.<sup>1</sup> É sintetizado no fígado, no baço e nos linfonodos.<sup>1</sup> O fator VIII é secretado como uma molécula que contém seis domínios: A1, A2, B, A3, C1 e C2. No complexo de Golgi, ele é clivado em duas partes: no aminoácido 1313 e no aminoácido 1648.<sup>2</sup> A primeira parte da molécula é chamada de cadeia pesada e tem 200 kDa, a segunda é chamada de cadeia leve e tem 80 kDa. As duas cadeias estão associadas, e essa associação é dependente de íon cobre.<sup>4</sup> A **Figura 13.11** esquematiza a molécula do fator VIII e a associação das duas cadeias.



**FIGURA 13.11** A molécula do fator VIII e a associação das duas cadeias.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

O fator VIII circula complexado, de forma não covalente, ao fator de von Willebrand, o qual prolonga sua meia-vida, estabiliza sua atividade, torna-o mais suscetível à ação da trombina e inibe a ação proteolítica do complexo proteína C-S.<sup>1,2</sup> O fator VIII circula como um complexo composto por VIII-C (propriedade coagulante do fator VIII, proteína que está reduzida no plasma de pacientes com hemofilia A e doença de von Willebrand), VIII-Ag (propriedade imunogênica do fator VIII, que pode ser medida por imunoenaios e que suscita a formação de anticorpos contra o fator VIII) e vWF-Ag (glicoproteína multimérica necessária para a adesão plaquetária e estabilização do fator VIII) e pela atividade de cofator da ristocetina (agregação plaquetária induzida pela ristocetina em plaquetas normais).<sup>1</sup> A **Figura 13.12** esquematiza a associação do fator VIII com o fvW.



**FIGURA 13.12** Esquema da associação do fator VIII com o fvW.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

A concentração de fator VIII circulante é muito baixa: cerca de 100 ng/mL,<sup>2</sup> e a meia-vida é de aproximadamente 8 a 12 horas.<sup>2</sup> Os níveis plasmáticos de fator VIII e fvW são constantes e na proporção de 1:50.<sup>2</sup> Existe uma classe de proteínas que está envolvida com a secreção e degradação do fator VIII. Essas proteínas são chamadas de chaperonas e mutações nessas proteínas levam à deficiência do fator VIII.<sup>1</sup> A interação do fator VIII com as chaperonas ocorre quando esse fator está no lúmen do retículo endoplasmático.<sup>2</sup>

O fator VIII é ativado pela trombina ou pelo fator X ativado. Ativação do fator VIII significa desassociação do fator de von Willebrand e clivagem nos resíduos de aminoácidos 740 e 1689.<sup>1</sup> A trombina cliva a cadeia pesada (200 kDa) na posição 740 e gera uma cadeia polipeptídica de 90 kDa que, posteriormente, é clivada pela própria trombina na posição 372 e gera duas cadeias polipeptí-







plaquetas.<sup>1</sup> No subendotélio, a ligação é feita com o colágeno do tipo I (podendo, também, associar-se ao colágeno do tipo IV e à fibronectina).<sup>1</sup> Os receptores plaquetários para o fvW são as glicoproteínas plaquetárias Ib e IIb/IIIa.<sup>1</sup> O fvW tem função tanto na hemostasia primária como na secundária; na primária, por fazer a adesão plaquetária ao endotélio lesado e, na secundária, porque estabiliza e protege o fator VIII da inativação.

## COFATORES CELULARES

### ⚡ FATOR III

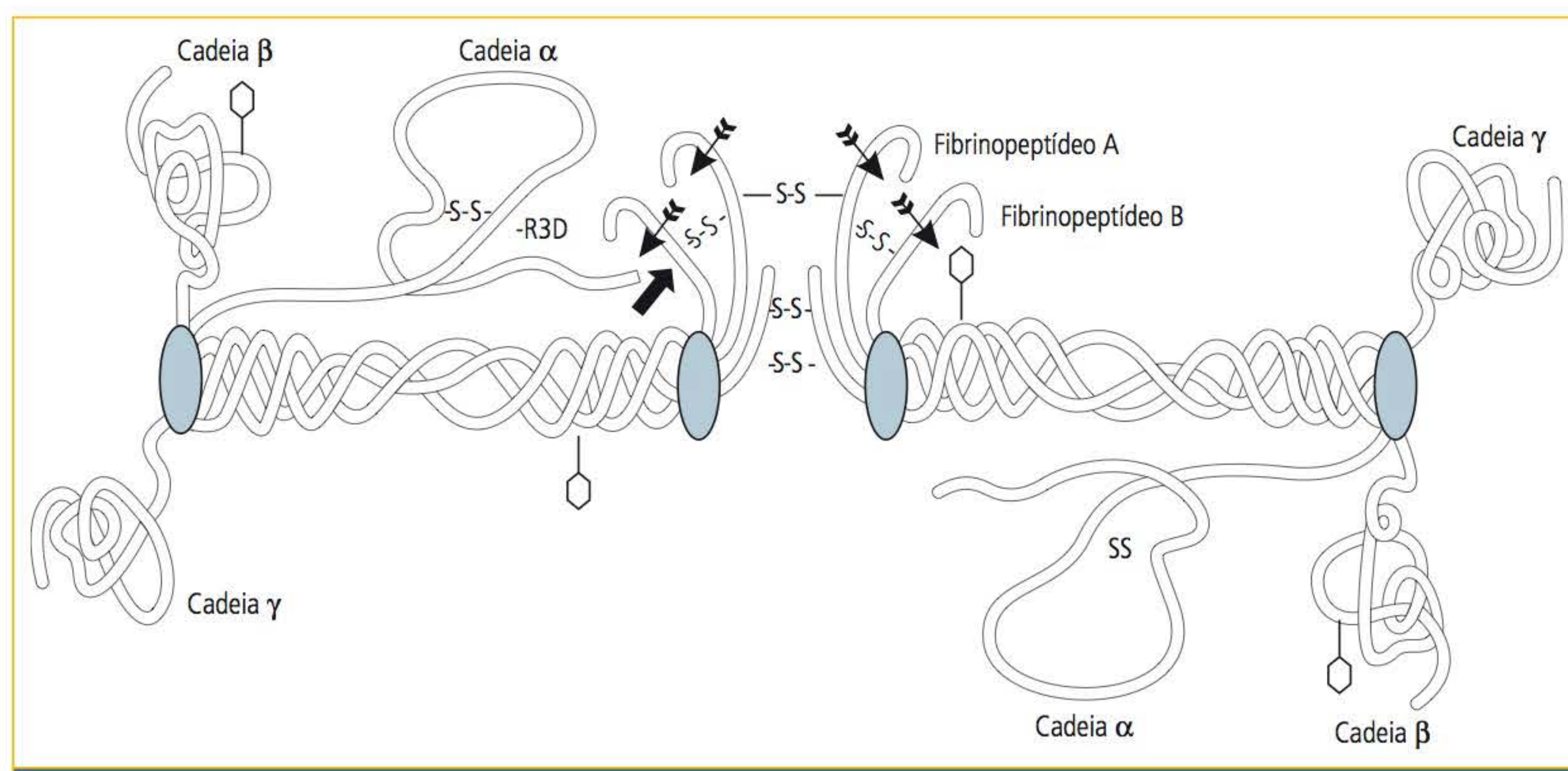
O fator tissular, também chamado de tromboplastina tecidual, é uma proteína de membrana integral<sup>2</sup> sintetizada no cromossomo 1, cujo peso molecular é de 43.000,<sup>2</sup> localizada na membrana citoplasmática da maioria das células endoteliais que revestem a luz dos vasos sanguíneos. Nas células em contato com o fluxo sanguíneo, o fator tissular só se expressa quando essas células estão ativadas ou por produtos bacterianos ou por citocinas inflamatórias. A expressão intravascular contribui para o estado pró-coagulante associado a inflamações ou infecções.<sup>1</sup> O fator tissular (FT) ativa especificamente o fator VII, e o complexo VII-TF é o principal iniciador fisiológico da coagulação sanguínea. Macrófagos, células endoteliais e neutrófilos somente expressam FT quando estão ativados.<sup>2,11</sup> O FT não requer ativação proteolítica para expressar sua atividade.

## PROTEÍNA ESTRUTURAL – FIBRINOGÊNIO

O fibrinogênio é chamado de proteína estrutural porque forma o coágulo sanguíneo sólido ao ser transformado em fibrina. O gene que codifica a molécula do fibrinogênio está localizado no cromossomo 4q23-q32, sua síntese é hepática e, além de ser encontrado no plasma, também está presente nos grânulos alfa das plaquetas.<sup>1,2</sup> As plaquetas não sintetizam o fibrinogênio, elas o endocitam.<sup>1</sup>

A molécula do fibrinogênio é uma glicoproteína dimérica com duas moléculas simétricas constituídas de três cadeias polipeptídicas:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) e  $\gamma$  (gama). Cada cadeia polipeptídica é codificada por um gene: os três genes estão localizados no cromossomo 4.<sup>2</sup> A cadeia  $\alpha$  possui 610 aminoácidos, a cadeia  $\beta$ , 461 aminoácidos e a cadeia  $\gamma$ , 411 aminoácidos.<sup>3</sup> A **Figura 13.14** mostra a representação da molécula do fibrinogênio.

Para que o fibrinogênio possa transformar-se em fibrina, a trombina cliva a cadeia  $\alpha$  entre a arginina 16 e a glicina 17, retirando um fibrinopeptídeo chamado de fibrinopeptídeo A.<sup>1</sup> A trombina também cliva a cadeia  $\beta$  entre a arginina e a glicina 15, formando o fibrinopeptídeo B;<sup>1</sup> a cadeia  $\gamma$  não é clivada.<sup>1</sup> Sem os fibrinopeptídeos A e B, o fibrinogênio pode formar o monômero de fibrina, o qual, uma vez formado, pode se polimerizar. Durante a polimerização, outras proteínas podem se aderir à rede de fibrina que está sendo formada, entre elas a fibronectina, a trombospondina e o fator de von Willebrand.<sup>1</sup>



**FIGURA 13.14** Representação da molécula do fibrinogênio.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>



O processo de polimerização requer a exposição do fragmento E, que está exposto somente após a remoção do fibrinopeptídeo A.<sup>2</sup> O fragmento E faz uma ligação não covalente com a região D da molécula de outro monômero de fibrina.<sup>2</sup> O polímero de fibrina é estabilizado pelo fator XIII ativado. Tanto o fibrinogênio quanto a fibrina têm receptores específicos para as integrinas plaquetárias, o que permite a associação das plaquetas à rede de fibrina formada.

A concentração plasmática do fibrinogênio está entre 200 e 300 mg/dL, e ele representa aproximadamente 2% das proteínas plasmáticas.<sup>2</sup>

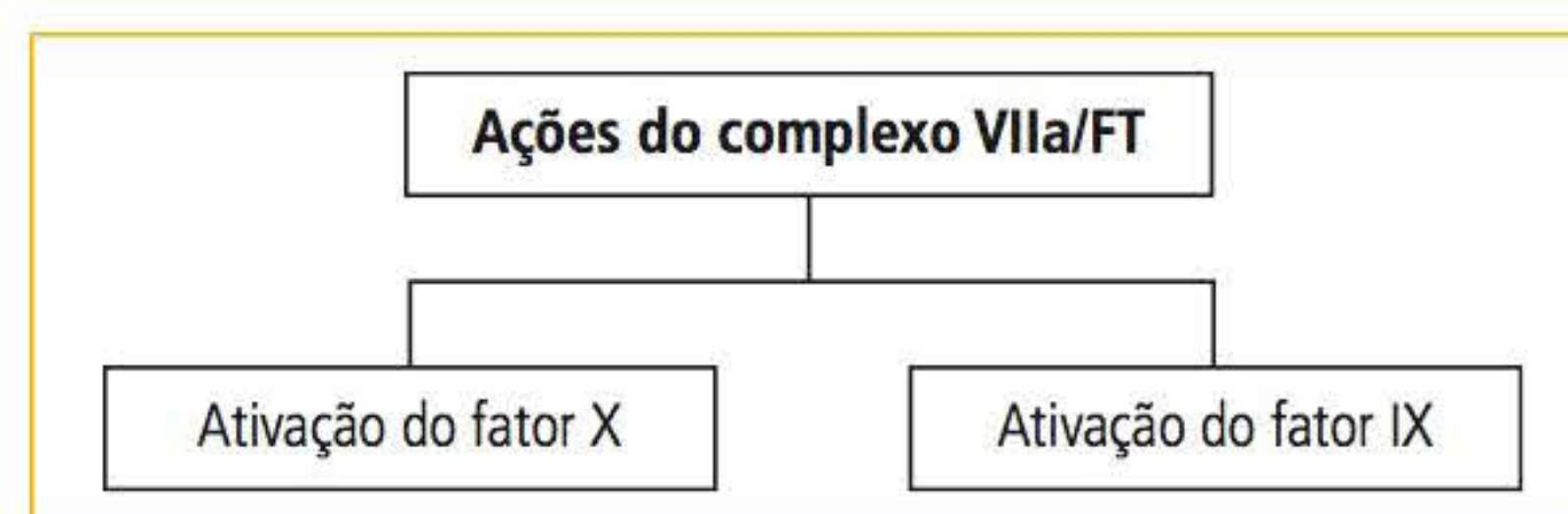
O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda porque sua concentração pode aumentar em até 20 vezes nos processos inflamatórios agudos.<sup>1</sup> Há uma correlação entre o aumento da concentração do fibrinogênio com a aterosclerose e eventos vasculares isquêmicos; o aumento do fibrinogênio é um fator de risco para a doença coronariana arterial; durante a gestação, sua concentração pode aumentar acima de cem vezes.<sup>1</sup> O aumento do fibrinogênio pode levar à formação de *roleaux* eritrocitário com consequente aumento da VHS.<sup>1</sup> A interleucina-6 é um mediador da resposta inflamatória que aumenta a concentração do fibrinogênio durante a resposta de fase aguda.<sup>1</sup>

### CASCATA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA IN VIVO

A finalidade da coagulação sanguínea é formar um coágulo no local em que o vaso sanguíneo foi lesado; esse coágulo funciona como um tampão para evitar a hemorragia. Essa ação pró-coagulante deve ficar restrita ao local da lesão; ela não pode disseminar-se pelo sistema circulatório. Ações anticoagulantes devem ser desencadeadas no local com a finalidade de restringir a ação pró-coagulante. No momento em que ocorre a lesão vascular, também se desencadeia a ação do sistema fibrinolítico e dos inibidores fisiológicos da coagulação. A célula endotelial tem um papel fundamental no controle das ações anticoagulante e pró-coagulante. A cascata da coagulação sanguínea refere-se apenas aos fatores plasmáticos da coagulação, mas está associada a um conjunto de ações que envolve plaquetas, células endoteliais, sistema fibrinolítico, inibidores fisiológicos da coagulação e mecanismos antifibrinolíticos.

A cascata da coagulação sanguínea inicia quando a célula endotelial, no sítio lesado, expõe o fator tissular (FT) e este fica unido a ela. O fator

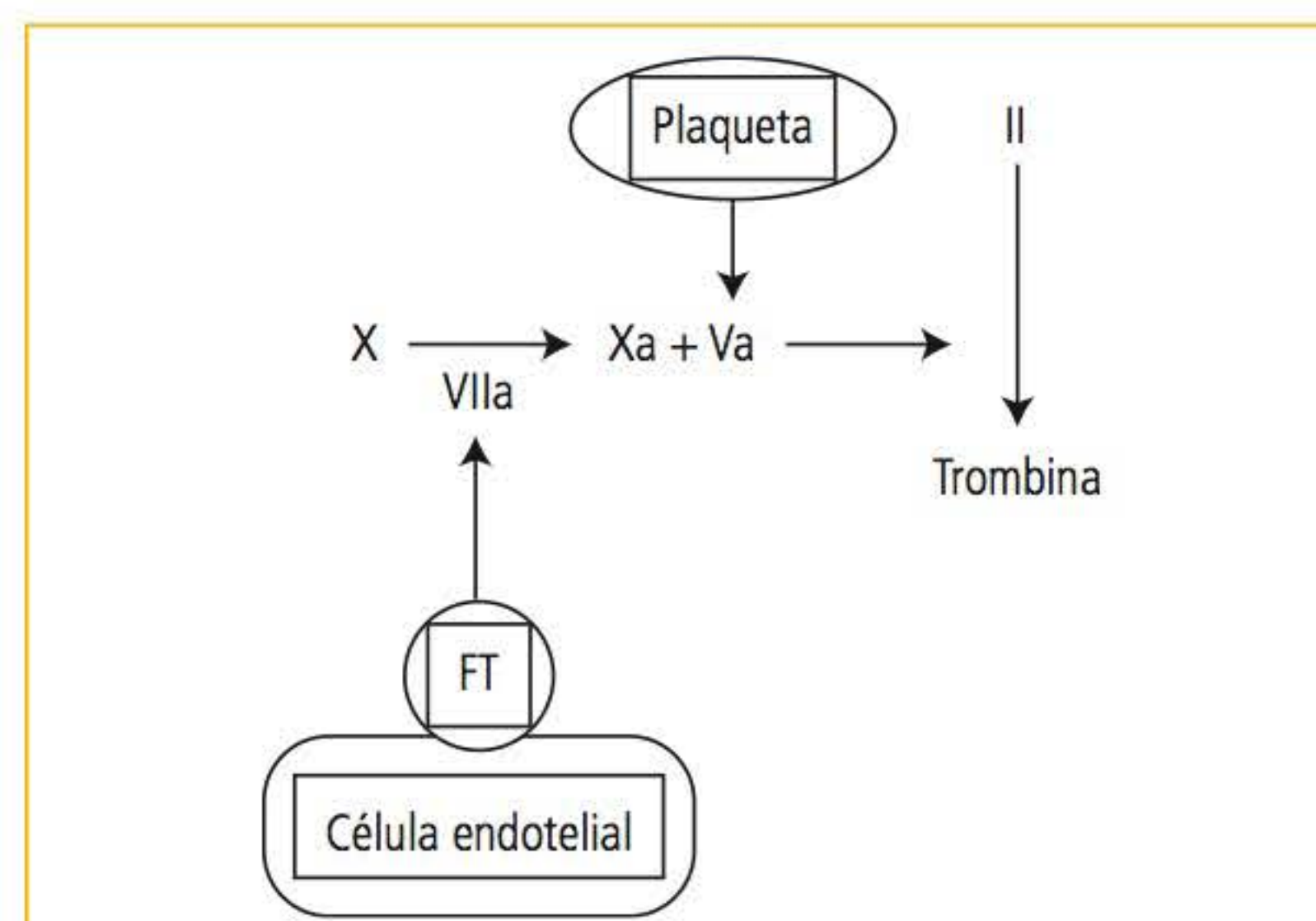
tissular fica ancorado à célula endotelial, via um domínio transmembrana, e age como um receptor para o fator VII.<sup>12</sup> Uma vez ligado ao FT, o fator VII torna-se ativado. O complexo VIIa/FT catalisa duas importantes reações: ativação do fator X (representa o início da ativação da cascata da coagulação, mas é incapaz de sustentar a formação de um coágulo de fibrina) e ativação do fator IX (sustenta a formação do coágulo de fibrina e torna a cascata da coagulação autocatalítica). A **Figura 13.15** mostra as ações do complexo VIIa/FT.



**FIGURA 13.15** Ações do complexo VIIa/FT.

O fator Xa e o fator IXa têm funções distintas e separadas na iniciação do processo da coagulação.<sup>13</sup> Quando o vaso sanguíneo é lesado, as plaquetas migram ao sítio da lesão. Elas ligam-se à matriz extravascular e produzem um tampão hemostático primário, tornando-se parcialmente ativadas nesse processo.<sup>12</sup> As plaquetas localizam-se muito próximas do complexo fator VIIa/FT.<sup>12</sup>

O fator Xa interage com o fator Va que foi liberado a partir das plaquetas ativadas e forma um complexo pró-trombinase, que gera uma pequena quantidade de trombina. Essa quantidade de trombina gerada não é suficiente para formar um coágulo de fibrina, mas é capaz de ativar as plaquetas, ativar o fator V, ativar o fator VIII e ativar o fator XI.<sup>14,15</sup> A **Figura 13.16** mostra a ativação da cascata da coagulação, via fator Xa.

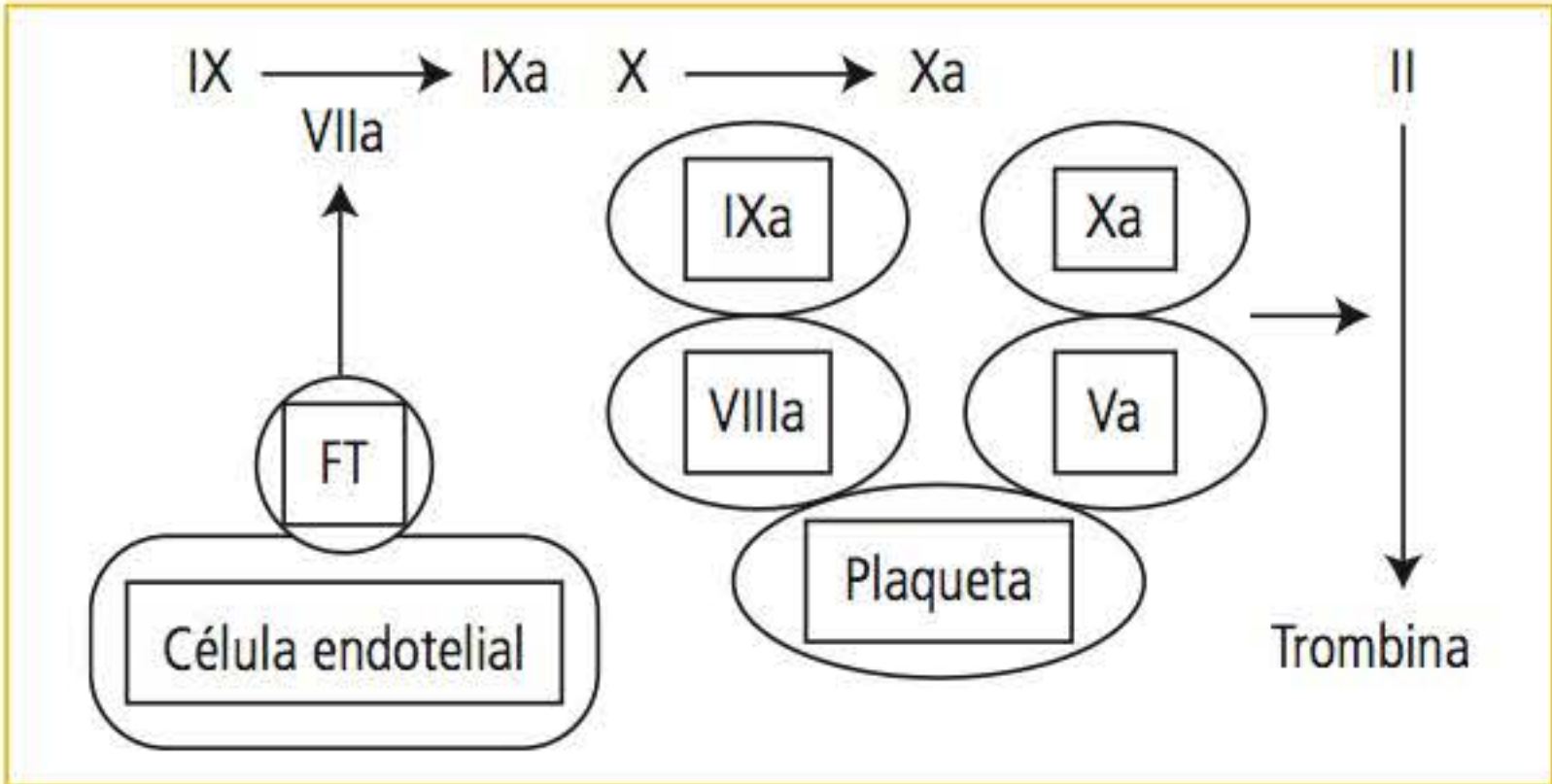


**FIGURA 13.16** Ativação da cascata da coagulação, via fator Xa.



A atividade do fator Xa, ativado a partir do complexo VIIa/TF, é restrita à célula endotelial que expressa o fator tissular. Se o fator Xa difunde-se além da superfície da célula endotelial, ele é rapidamente inibido pela via do inibidor do fator tissular (TFPI, do inglês *tissue factor pathway inhibitor*) ou da antitrombina (AT).<sup>12</sup>

O fator IXa, ativado pelo complexo VII/FT, migra para a superfície plaquetária; ele pode se difundir porque não é inibido pelo TFPI. O fator IX também passa a ser ativado pelo fator XI, que foi ativado pela trombina. As plaquetas aderem-se e agregam-se no mesmo sítio onde houve a expressão do FT. As plaquetas ativadas são a base física de ligação dos fatores Va e VIIIa (ativados pela trombina). O fator IXa liga-se ao fator VIIIa, sobre a superfície plaquetária, e ativa o fator X de modo definitivo. O fator X une-se ao fator Va, sobre a superfície plaquetária, e gera uma quantidade de trombina responsável pela quebra da molécula do fibrinogênio e formação da rede de fibrina. A partir desse ponto, a cascata da coagulação torna-se autocatalítica, ou seja, é necessário um mecanismo de inibição da cascata da coagulação. A **Figura 13.17** esquematiza a cascata da coagulação via fator IXa.



**FIGURA 13.17** Ativação da cascata da coagulação via fator IXa.

Os mecanismos de inibição da cascata da coagulação são os inibidores fisiológicos da coagulação (proteína S, proteína C, trombomodulina e antitrombina, entre outros). Uma vez que o coágulo é formado, ele deve ser retirado da circulação, e essa é a função do sistema fibrinolítico.

Nessa visão da cascata da coagulação,<sup>12</sup> não foram relacionados os fatores XII, cininogênio de alto peso molecular (HK) e pré-caliceína (PK). Pessoas que têm deficiência desses fatores não apresentam doença hemorrágica, e deficientes de XI cursam com episódios hemorrágicos em deter-

minadas situações (ver Zimogênios – fatores não dependentes de vitamina K – fator XI).

**COAGULOPATIAS**

Coagulopatia é o termo usado para se referir às doenças causadas por deficiência dos fatores plasmáticos da coagulação sanguínea, que pode ser hereditária ou adquirida. As coagulopatias hereditárias podem ser ligadas ao sexo (cromossomo X), herança autossômica dominante e herança autossômica recessiva.<sup>1</sup> As adquiridas podem resultar de deficiência da vitamina K, doença hepática, coagulação intravascular disseminada, fibrinogênólise e inibidores patológicos da coagulação.<sup>1</sup>

**COAGULOPATIAS HEREDITÁRIAS**

As doenças hemorrágicas relacionadas com os fatores da coagulação são chamadas de coagulopatias hereditárias e caracterizam-se por história familiar positiva, sangramentos do tipo hematoma e hemartroses (extravasamento sanguíneo nas articulações) e também podem estar relacionadas ao sexo.

**Deficiência do fator VIII (hemofilia A) e fator IX (hemofilia B)**

A hemofilia A e a hemofilia B caracterizam-se por serem uma herança ligada ao sexo, pelo fato de o gene estar localizado no cromossomo X. A diferença entre as duas está no fator deficiente: o modo de se fazer o diagnóstico e o quadro clínico apresentado pelos pacientes são idênticos, mas o tratamento é diferente.<sup>1</sup>

O homem hemofílico não transmite a hemofilia aos seus filhos: a transmissão dá-se aos seus netos por meio de suas filhas. Diversos cruzamentos podem ser feitos para exemplificar a transmissão da hemofilia. A **Figura 13.18** exemplifica o cruzamento de um homem hemofílico com uma mulher normal.

Homem hemofílico = X <sup>h</sup> Y		Mulher normal = XX	
Cruzamento		X <sup>h</sup> Y	x      XX
Descendentes	X <sup>h</sup> X	e	X <sup>h</sup> X    50% mulher portadora
	XY	e	XY      50% homem normal

**FIGURA 13.18** Cruzamento de um homem hemofílico com uma mulher normal.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

De acordo com a **Figura 13.18**, pode-se afirmar que a probabilidade da descendência será de 50%



de mulheres portadoras de hemofilia e de 50% de homens normais. A **Figura 13.19** exemplifica o cruzamento de uma mulher portadora com um homem normal.

Mulher portadora = $X^H X$		Homem normal = $XY$	
Cruzamento	$X^H X$	x	$XY$
Descendentes	$X^H X$	25% mulher portadora	
	$XX$	25% mulher normal	
	$X^H Y$	25% homem hemofílico	
	$XY$	25% homem normal	

**FIGURA 13.19** Cruzamento de uma mulher portadora com um homem normal.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

Outra possibilidade é o cruzamento de um homem hemofílico com uma mulher portadora, situação rara de acontecer devido à seleção natural. A **Figura 13.20** exemplifica o cruzamento de um homem hemofílico com uma mulher portadora.

Homem hemofílico = $X^H Y$		Mulher portadora = $X^H X$	
Cruzamento	$X^H Y$	x	$X^H X$
Descendentes	$X^H X$	25% mulher portadora	
	$X^H X^H$	25% mulher hemofílica	
	$X^H Y$	25% homem hemofílico	
	$XY$	25% homem normal	

**FIGURA 13.20** Cruzamento de um homem hemofílico com uma mulher portadora.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

Uma mulher hemofílica pode ser gerada a partir do cruzamento de uma mulher portadora com um homem hemofílico.

A hemofilia A pode ser classificada em grave, moderada e leve conforme a concentração de fator VIII que o paciente apresenta. Na hemofilia grave, que ocorre em 50 a 60% dos pacientes,<sup>2</sup> o paciente apresenta uma concentração de fator VIII abaixo de 2%<sup>2</sup> e hemorragias espontâneas<sup>1</sup> nas articulações (hemartroses), no tecido muscular e nos órgãos internos.<sup>2</sup> Na hemofilia moderada, que ocorre em 25 a 30% dos pacientes,<sup>2</sup> a concentração de fator VIII está entre 2 a 5%, e ocorrem hemorragias frente a pequenos traumas.<sup>2</sup> Na hemofilia leve, que ocorre em 15 a 20% dos pacientes,<sup>2</sup> o nível de fator VIII está entre 5 a 30%, e hemorragias só são observadas frente a traumas significativos ou cirurgias.<sup>2</sup> Pessoas com atividade de fator VIII

acima de 30% não apresentam sinais clínicos de hemofilia A.<sup>2</sup> A maioria dos pacientes com hemofilia A tem níveis de fator VIII abaixo de 5%.<sup>1</sup> Uma característica das coagulopatias é o tipo de hemorragia (hematomas e hemartroses) que o paciente apresenta, que permite a diferenciação clínica entre a púrpura e a coagulopatia. Um entre 5 mil a 10 mil homens nascidos apresenta deficiência para o fator VIII.<sup>1,2</sup>

Um hemofílico pode apresentar sangramento em qualquer órgão após uma lesão vascular. A principal complicação são as hemartroses, que podem levar a um quadro inflamatório e de atrofia.<sup>1</sup> Hematúria sem doença geniturinária é um achado comum.<sup>1</sup>

A deficiência do fator IX causa a hemofilia B, sendo que 1 a cada 25.000 a 30.000 homens são afetados.<sup>12</sup> Conforme o tipo de mutação que ocorre no fator IX, pode-se manifestar na forma da hemofilia B de Leyden e hemofilia B<sub>m</sub>.<sup>12</sup>

A mutação na hemofilia B de Leyden<sup>16</sup> ocorre na região promotora do gene, na qual também há uma região responsiva a andrógenos; isso, na medida em que a idade aumenta, leva a um estímulo para produção do fator IX.<sup>1</sup> Com o avanço da idade, as manifestações clínicas tendem a diminuir.<sup>1</sup> O fator IX de Leyden é uma forma de hemofilia B caracterizada por um sangramento grave na infância. A atividade e o nível antigênico do fator IX estão abaixo de 1%<sup>2</sup> e, no início da puberdade ou com a administração de terapia com andrógenos, os níveis de fator IX elevam-se para 30 a 60% do normal, e os sinais clínicos da hemofilia B desaparecem.<sup>2</sup>

Na hemofilia B, estão descritas mutações como deleções, inserções e mutações de ponto (triplas, duplas e únicas),<sup>2</sup> que levam à diminuição da atividade coagulante por alterarem o reconhecimento dos pontos de clivagem. A hemofilia B é semelhante à hemofilia A.<sup>12</sup> Todas as filhas de um homem hemofílico B são afetadas, enquanto seus filhos são normais.<sup>12</sup> Quando o nível de atividade coagulante do fator IX está abaixo de 25% do normal, podem ocorrer sangramentos, especialmente após traumatismos.<sup>12</sup>

Na hemofilia B<sub>m</sub>, ocorre um aumento do tempo de protrombina quando a tromboplastina utilizada é de cérebro bovino,<sup>1,2</sup> devido à presença de inibidores do complexo fator tissular-fator VII ativado.<sup>2</sup> Se a tromboplastina utilizada for extraída de cérebro de coelho, o TP vai se mostrar normal.<sup>1</sup>



A letra “m” após o termo hemofilia B é a designação do nome Martin.<sup>17</sup> A hemofilia B<sub>m</sub>, além do aumento do TP frente a cérebro bovino, caracteriza-se pela deficiência da atividade coagulante do fator IX.

O diagnóstico laboratorial do paciente hemofílico deve incluir o TP, TTPa, tempo de sangramento e a contagem de plaquetas.<sup>1</sup> O esperado é que tenha TP normal (porque ele não mede fator IX), TTPa alterado (um dos fatores medidos é o fator IX) e tempo de sangramento e contagem de plaquetas normais. O tempo de sangramento e a contagem de plaquetas devem ser realizados para afastar a possibilidade de doença de von Willebrand, que está associada à deficiência do fator VIII. Frente a esse quadro laboratorial, deve ser feita a dosagem específica do fator VIII e do IX (o TTPa também mede o fator VIII). O diagnóstico laboratorial de qual fator está deficiente deve ser feito porquê, como já citado, o tratamento da hemofilia A e da B são distintos.

Uma complicação no tratamento de pacientes com hemofilia A é a presença de inibidores do fator VIII, que são, na sua maioria, anticorpos do tipo IgG (com um predomínio significativo do subtipo IgG4).<sup>2</sup> Cerca de 80% dos pacientes com hemofilia A que apresentam níveis de fator VIII abaixo de 1% têm anticorpos antifator VIII.<sup>1</sup> Cerca de 2% dos pacientes com hemofilia B desenvolvem anticorpos contra o fator IX.<sup>2</sup> A presença de inibidores do fator VIII e do fator IX pode ser verificada ao se incubar (por 1-2 horas a 37 °C) o plasma do paciente com um plasma normal na proporção de 1:1. Na presença do anticorpo, o TTPa continuará prolongado; caso não haja anticorpos, o TTPa será corrigido.<sup>1,2</sup>

### Deficiência do fator II

A deficiência de protrombina pode ser por hipoprotrombinemia ou por disprotrombinemia<sup>1</sup>, que são coagulopatias muito raras.<sup>2</sup> A primeira refere-se a uma diminuição na concentração da protrombina. Para uma hemostasia normal, o nível de protrombina deve ser de 25% (com relação ao nível normal); para que se tenha doença hemorrágica, os níveis de protrombina devem estar entre 1 a 2% do normal.<sup>1</sup> A segunda refere-se a uma alteração na molécula da protrombina, que não perde a capacidade antigênica, mas a atividade está diminuída. As duas situações são herdadas de modo autossômico recessivo.<sup>1</sup> A ausência

total de atividade da protrombina é incompatível com a vida.<sup>2</sup>

Os heterozigotos para hipoprotrombinemia têm cerca de 50% de concentração de protrombina; nos homozigotos, a concentração está abaixo de 10%.<sup>1</sup> Nesses pacientes, tanto a atividade como a antigenicidade da protrombina estão diminuídas. Na disprotrombinemia, os heterozigotos têm uma atividade em torno de 50% do normal com níveis antigênicos normais e, nos homozigotos, a atividade está entre 1 a 20% do normal, enquanto o nível antigênico está normal ou discretamente diminuído.<sup>1</sup>

De modo geral, pode-se dizer que pacientes com concentração de protrombina de 1% de atividade podem sangrar espontaneamente ou após trauma. Sangramento cirúrgico pode ser significativo. Podem ocorrer menorrágia, epistaxe, sangramento gengival e hematomas. Hemartroses podem ocorrer, mas são menos frequentes que na hemofilia.<sup>12</sup> Em pacientes cuja concentração de protrombina está entre 2 a 5% de atividade, o sangramento é variável. Alguns pacientes sangram após pequenos traumatismos, e outros são assintomáticos.<sup>12</sup> Pacientes com atividade de protrombina entre 5 a 50% do normal geralmente sangram frente a traumatismo intenso ou cirurgias, outros não apresentam sangramento.<sup>12</sup>

Tanto na hipo como na disprotrombinemia, o TP e o TTPa estão alterados (aumentados de modo variável, dependendo da concentração da protrombina). Nessa situação, é importante fazer-se o tempo de trombina (TT). A técnica para a realização do TT baseia-se em adicionar, ao plasma, a trombina, que irá agir sobre o fibrinogênio; portanto, na deficiência da protrombina, o TT está normal.<sup>1,2</sup> Os mesmos resultados descritos para a hipo e disprotrombinemia ocorrem nas deficiências dos fatores que são medidos pelo TP e TTPa, como o fator V e o fator X. O diagnóstico definitivo da disprotrombinemia ou hipoprotrombinemia requer que a dosagem dos outros fatores, que são medidos pelo TP e TTPa, estejam normais.<sup>2</sup> O tempo de sangramento está normal.<sup>2</sup>

### Deficiência do fator VII

A deficiência do fator VII é rara<sup>1</sup> (a incidência é de 1 a cada 500.000 pessoas),<sup>2</sup> herdada de modo autossômico recessivo,<sup>1,2</sup> e o quadro hemorrágico somente se manifesta em homozigotos.<sup>1,2</sup> Pacientes com níveis abaixo de 1% de fator VII apresentam



um quadro clínico indistinto da hemofilia grave, A ou B.<sup>1,2,12</sup> Níveis acima de 5% cursam com uma doença hemorrágica moderada.<sup>1,12</sup> O diagnóstico laboratorial é feito a partir de um TP alterado e um TTPa normal. Nessa situação, deve ser feita a dosagem específica do fator VII. O tempo de sangramento está normal.<sup>2</sup>

### Deficiência do fator X

A deficiência do fator X é herdada de modo autosômico recessivo,<sup>1</sup> e a incidência é de 1 a cada 500.000 pessoas.<sup>2</sup> Pacientes com concentrações de fator X abaixo de 1% apresentam sangramentos espontâneos e após traumas<sup>1</sup> e um quadro clínico semelhante ao da hemofilia.<sup>2</sup> Pacientes com nível de atividade do fator X acima de 15% têm poucos episódios hemorrágicos; as hemorragias podem ocorrer em cirurgias de grande porte e em traumas intensos.<sup>2</sup> O diagnóstico laboratorial apresenta o TP e o TTPa alterados com TT normal. Nessa situação, deve ser feita a dosagem específica do fator X.<sup>12</sup> O tempo de sangramento está normal.<sup>2</sup>

### Deficiência do fator V

É herdada de modo autossômico recessivo.<sup>1</sup> A doença hemorrágica manifesta-se em homozigotos com níveis de fator V que variam entre 1 a 10%.<sup>1</sup> Laboratorialmente, a deficiência do fator V apresenta TP e TTPa alterados e TT normal. O diagnóstico definitivo é feito pela dosagem do fator V.<sup>2</sup> O tempo de sangramento pode estar aumentado na deficiência grave de fator V pelo fato de a concentração do fator V plaquetário estar muito diminuída.<sup>2</sup>

### Deficiência do fator XI

Herdada de modo autossômico recessivo.<sup>1</sup> Os pacientes podem ser divididos em duas categorias:<sup>18</sup> pacientes com uma coagulopatia mais grave (geralmente, são homozigotos) e pacientes com uma coagulopatia leve (episódios hemorrágicos leves ou assintomáticos; geralmente, são heterozigotos). Os pacientes que apresentam episódios hemorrágicos em geral o fazem frente a traumas ou procedimentos cirúrgicos.<sup>2</sup> Sangramentos após extrações dentárias podem ocorrer.<sup>2</sup> Laboratorialmente, esses pacientes apresentam TP e TT normais com TTPa prolongado. O diagnóstico definitivo se faz pela dosagem do fator XI.

A deficiência do fator XI causa sangramentos excessivos em tecidos com alta atividade fibrinolítica, como trato urinário, amígdalas, mucosa

nasal e dentes. Apresenta um baixo risco de sangramento em tecidos com pouca atividade fibrinolítica, como na apendicectomia, colecistectomia, circuncisão, e em cirurgias ortopédicas.

Existe uma enzima chamada de procarboxipeptidase B (TAFI), que é uma potente inibidora da fibrinólise. Quando a trombina é formada e se liga à trombomodulina, ocorre a ativação da TAFI, que se torna mais ativada na presença do fator XI. Na deficiência dos fatores VIII, IX e XI, não ocorre a geração de trombina, ou ela é gerada em menor escala. Isso retarda a formação do coágulo e, como não há uma quantidade suficiente de trombina, a TAFI não está ativada, ou está ativada em menor escala; com isso, não há inibição da fibrinólise, e o coágulo formado é destruído precocemente.

### Deficiência do fator XIII

A herança é autossômica recessiva, com uma incidência de aproximadamente 1 em cada 2 milhões de pessoas.<sup>1</sup> Três formas de deficiência de fator XIII podem ocorrer:<sup>19</sup> na deficiência do tipo I, tanto a subunidade A como a B do fator XIII estão ausentes; na deficiência do tipo II, a subunidade A está ausente e a B presente; e, na deficiência do tipo III, a subunidade B está ausente. O sangramento, nesses casos, geralmente está associado com trauma, com exceção da hemorragia intracraniana, que ocorre em 25% dos pacientes.<sup>2,12</sup> Sangramentos durante procedimentos cirúrgicos não são excessivos, mas o sangramento após o procedimento cirúrgico e dificuldades na cicatrização são características da deficiência do fator XIII<sup>2</sup> e ocorrem em 15% dos pacientes. Em alguns pacientes, o sangramento pode-se manifestar entre 12 a 36 horas após o traumatismo.<sup>1</sup> Laboratorialmente, caracteriza-se por ter TP, TTPa e tempo de sangramento normais.<sup>2</sup> O TT pode estar um pouco prolongado, devido ao aumento da quebra da fibrina com consequente aumento dos produtos de degradação da fibrina.<sup>12</sup> Um teste específico para a deficiência de fator XIII é a solubilidade do coágulo frente a soluções de ureia (5 molar), o coágulo deficiente de fator XIII solubiliza em poucos minutos, enquanto um coágulo normal leva pelo menos 24 horas para solubilizar.<sup>1,2</sup> A atividade do fator XIII também pode ser determinada quantitativamente.<sup>12</sup>

### Deficiência do fator XII, pré-caliceína (PK) e cininogênio de alto peso molecular (HK)

A deficiência do fator XII é herdada como uma herança autossômica recessiva e não está



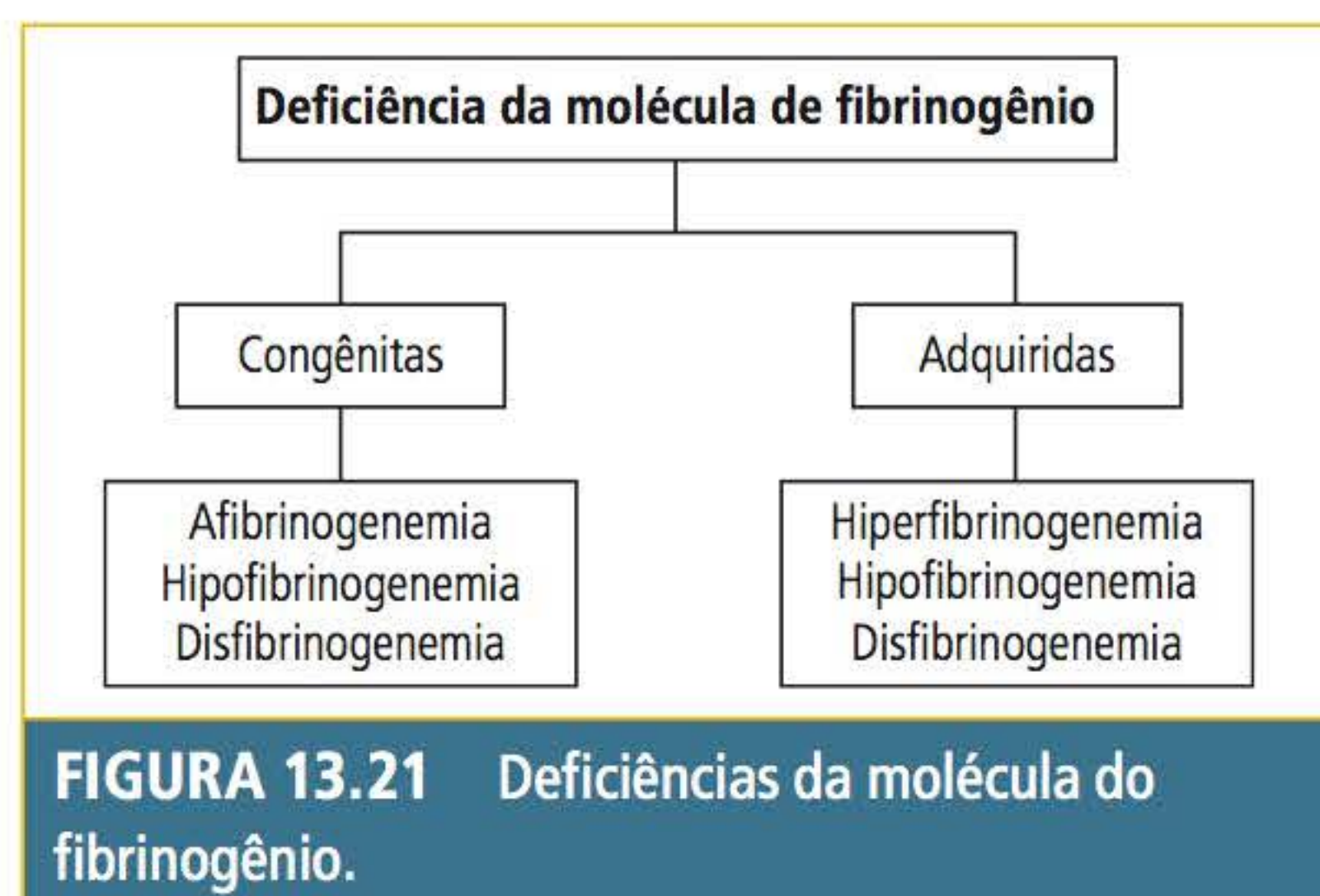
correlacionada com doença hemorrágica, mas laboratorialmente se caracteriza por ter um TTPa alterado (muitas vezes acima de 100 segundos)<sup>2</sup> com TP e TT normais. Na maioria dos pacientes, o tempo de sangramento é normal.<sup>2</sup> Essa discrepância acontece porque o fator XII é muito importante para iniciar a coagulação *in vitro*, mas não *in vivo*, como já foi descrito.

A pré-caliceína é herdada de modo autossômico recessivo, e sua deficiência não está correlacionada com manifestações hemorrágicas.<sup>1</sup> Ela tem um papel fundamental na manutenção da ativação do fator XII, na resposta inflamatória e na quimiotaxia leucocitária. Laboratorialmente, caracteriza-se por apresentar TTPa aumentado, TP e TT normais.

Os pacientes deficientes de cininogênio de alto peso molecular apresentam um TTPa prolongado e não têm episódios hemorrágicos;<sup>2</sup> a herança é autossômica recessiva.<sup>2</sup>

### Deficiência do fator I

As deficiências do fibrinogênio podem ser classificadas em congênicas ou adquiridas.<sup>2</sup> As congênicas são classificadas em afibrinogenemia, hipofibrinogenemia e disfibrinogenemias.<sup>2</sup> As primeiras referem-se à concentração do fibrinogênio: a afibrinogenemia é a ausência do fibrinogênio, e a hipofibrinogenemia refere-se a uma diminuição na concentração do fibrinogênio. As disfibrinogenemias referem-se a uma alteração na molécula do fibrinogênio. As anomalias adquiridas do fibrinogênio são classificadas em hiperfibrinogenemia, hipofibrinogenemia e disfibrinogenemias.<sup>2</sup> A **Figura 13.21** esquematiza as deficiências da molécula do fibrinogênio.



### Deficiência congênita do fator I

Na afibrinogenemia e na hipofibrinogenemia, os três genes estão presentes. O problema está na

síntese, na secreção ou no processamento do RNA mensageiro.<sup>1</sup>

A afibrinogenemia é rara e herdada de modo autossômico recessivo.<sup>1</sup> As manifestações hemorrágicas variam de leve a intensas.<sup>1</sup> O sangramento pelo cordão umbilical pode ser a primeira manifestação e causa de óbito em recém-nascidos.<sup>1</sup> Posteriormente, as manifestações podem ser gengivorragias, epistaxes, menorragia, hematoma, abortos espontâneos e hemartroses.<sup>1</sup> A principal causa de óbito é o sangramento intracraniano.<sup>1</sup> Geralmente, os sangramentos ocorrem quando a concentração de fibrinogênio está abaixo de 50 mg/dL e associada com traumas e procedimentos cirúrgicos.<sup>2</sup> Quando a hipofibrinogenemia é causada por falta de secreção do fibrinogênio, este permanece no retículo endoplasmático do hepatócito e causa uma disfunção hepática,<sup>1</sup> caracterizando uma doença de estoque que cursa com aumento das enzimas hepáticas e progressão para a cirrose.<sup>2,20,21</sup> Todos os testes de coagulação estão alterados (TTPa, TP e TT) e podem ser corrigidos pela adição de plasma normal ou fibrinogênio purificado.<sup>2</sup> O diagnóstico laboratorial é feito pela dosagem imunológica do fibrinogênio. Na hipofibrinogenemia, a concentração do fibrinogênio está diminuída, e este pode ser dosado pelos testes de atividade, ou seja, que geram a formação de coágulos.<sup>1</sup> O tempo de sangramento tanto na hipo como na afibrinogenemia pode estar aumentado, provavelmente pela dificuldade de ocorrer a agregação plaquetária pela ausência ou diminuição da concentração do fibrinogênio tanto no plasma como nas plaquetas;<sup>1</sup> a agregação plaquetária é dependente de fibrinogênio.

As disfibrinogenemias são herdadas de modo autossômico dominante<sup>1</sup> e podem ser causadas por defeitos na polimerização dos monômeros de fibrina ou na quebra da molécula do fibrinogênio para gerar os fibrinopeptídeos. Alguns pacientes podem gerar coágulos de fibrina resistentes à ação do sistema fibrinolítico e têm tendência a episódios trombóticos.<sup>1</sup> Os pacientes com disfibrinogenemias podem apresentar tanto doença hemorrágica quanto trombótica.<sup>1</sup> A principal característica das disfibrinogenemias é a alteração do TP e do TTPa e uma concentração de fibrinogênio que geralmente está normal quando medida por métodos imunológicos, mas os testes de atividade (formação de coágulo de fibrina) revelam a não formação do coágulo de fibrina.<sup>2</sup>



### Deficiência adquirida do fator I

A concentração do fibrinogênio aumenta significativamente com a idade, em fumantes, em hipertensos e obesos, e pacientes com diabetes melito tendem a fazer hiperfibrinogenemia.<sup>2</sup> A hiperfibrinogenemia é um fator de risco para infarto do miocárdio e doença coronariana isquêmica.<sup>2</sup> A hiperfibrinogenemia pode ser devida a um polimorfismo genético que também está associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares e aterosclerose.<sup>2</sup> O aumento na concentração do fibrinogênio também pode ser uma resposta a um processo inflamatório.<sup>2</sup>

A hipofibrinogenemia está associada à falência hepática fulminante e a uma cirrose hepática descompensada.<sup>2</sup> A administração de L-asparaginase está correlacionada à queda da concentração de fibrinogênio.<sup>2</sup>

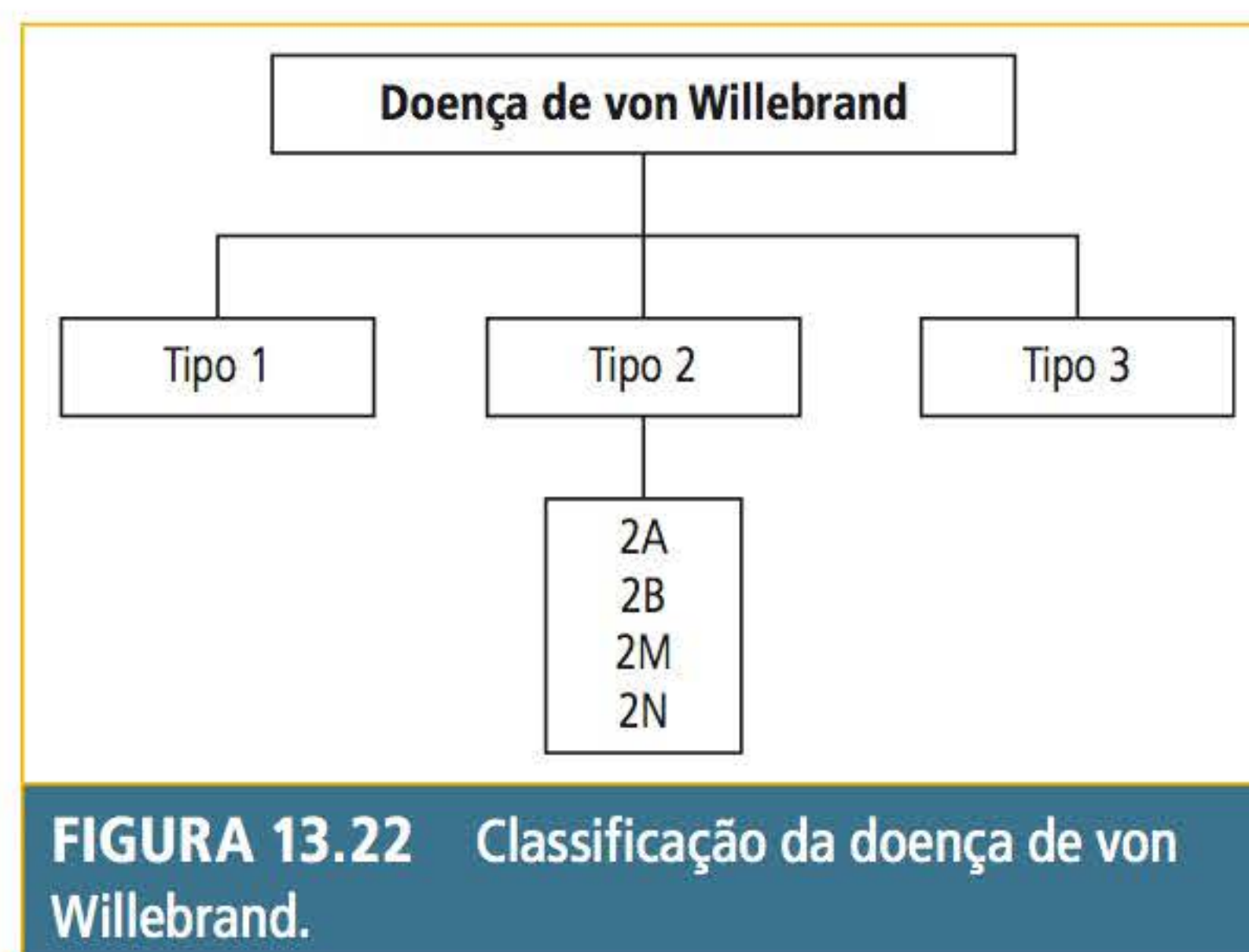
A disfibrinogenemia está associada com doenças hepáticas como cirrose hepática, cirrose hepática viral e hepatite tóxica. Nessas doenças, cerca de 50% dos pacientes apresenta um quadro de disfibrinogenemia.<sup>2</sup>. A disfibrinogenemia pode ser secundária ao desenvolvimento de autoanticorpos contra a molécula do fibrinogênio, o que pode ocorrer no lúpus eritematoso sistêmico<sup>2</sup> e no mieloma múltiplo por inibição da polimerização dos monômeros de fibrina.<sup>2,22</sup>

### Doença de von Willebrand

A doença de von Willebrand (dvW) foi descrita pela primeira vez em 1926, por Erik von Willebrand.<sup>2,23</sup> A herança que predomina é autossômica dominante, na qual a presença de um alelo mutante causa a doença, e a presença de dois alelos mutantes causa uma doença mais grave.<sup>1,2</sup> A penetrância e a expressividade do gene é bastante variável.<sup>2</sup> A incidência da dvW é de 35 a 100 afetados para cada 1 milhão de pessoas, e essa incidência é comparada com a da hemofilia A.<sup>2,24</sup>

A dvW é classificada em três tipos: tipo 1, tipo 2 e tipo 3.<sup>2,25</sup> O tipo 2 apresenta as variantes 2A, 2B, 2M e 2N,<sup>1</sup> os tipos 2N e 3 apresentam herança autossômica recessiva, os demais são herança autossômica dominante.<sup>1</sup> A **Figura 13.22** traz a classificação da doença de von Willebrand.

A dvW do tipo 1 é caracterizada pela diminuição parcial da concentração do fator de von Willebrand (fvW), mas a molécula tem função normal.<sup>2</sup> A concentração do fator VIII cai proporcionalmente à concentração do fvW.<sup>2</sup> O tipo 1 representa



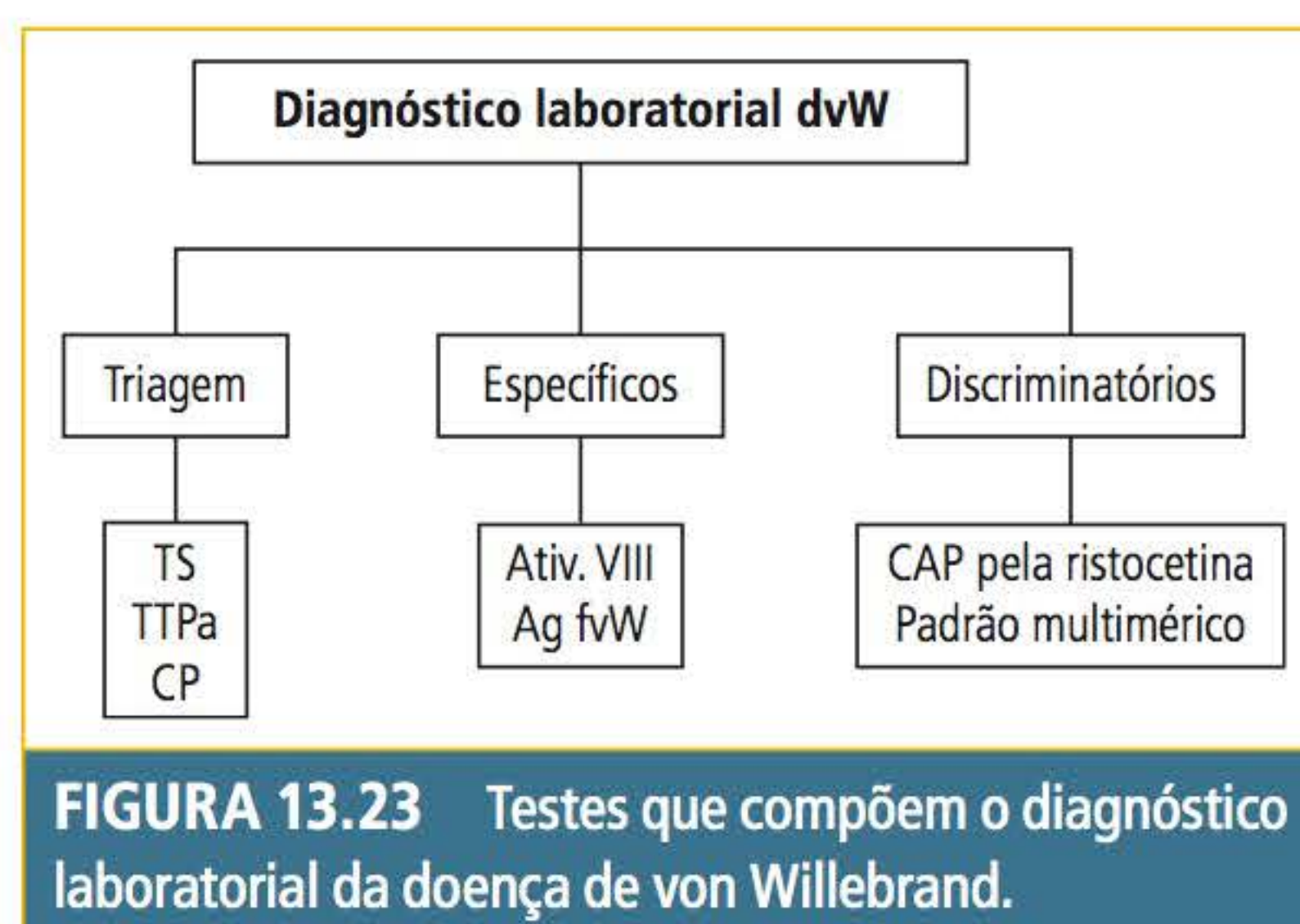
**FIGURA 13.22** Classificação da doença de von Willebrand.

entre 60 a 80% dos casos da dvW.<sup>1,2</sup> O tipo e a intensidade do sangramento são proporcionais à concentração do fvW.<sup>1,2</sup> Pacientes com níveis de fvW próximos ao normal são difíceis de ser diagnosticados. Nas formas graves da doença (os níveis de fvW e fator VIII estão muito diminuídos), ocorrem hematomas e hemartroses, e a doença pode ser confundida com hemofilia.<sup>1</sup> Nas formas mais leves da doença, o paciente pode ser assintomático.<sup>1</sup>

O tipo 2 é caracterizado pela deficiência qualitativa da molécula; a concentração do antígeno de von Willebrand é normal, mas a molécula não é funcional. Essa variante representa cerca de 7 a 30% dos casos.<sup>2</sup>

O tipo 3 é caracterizado pela ausência do fvW, representa 5% dos casos e é uma forma grave da doença.<sup>2</sup>

O diagnóstico laboratorial da doença envolve os testes de triagem, específicos e discriminatórios, apresentados na **Figura 13.23**.



**FIGURA 13.23** Testes que compõem o diagnóstico laboratorial da doença de von Willebrand.

TS, tempo de sangramento; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativada; CP, contagem de plaquetas; Ativ. VIII, atividade de fator VIII, dosagem de fator VIII; Ag fvW, antígeno do fator de von Willebrand; CAP, curva de agregação plaquetária frente à ristocetina; padrão multimérico, eletroforese em gel para separação dos múltiplos do fator de von Willebrand.

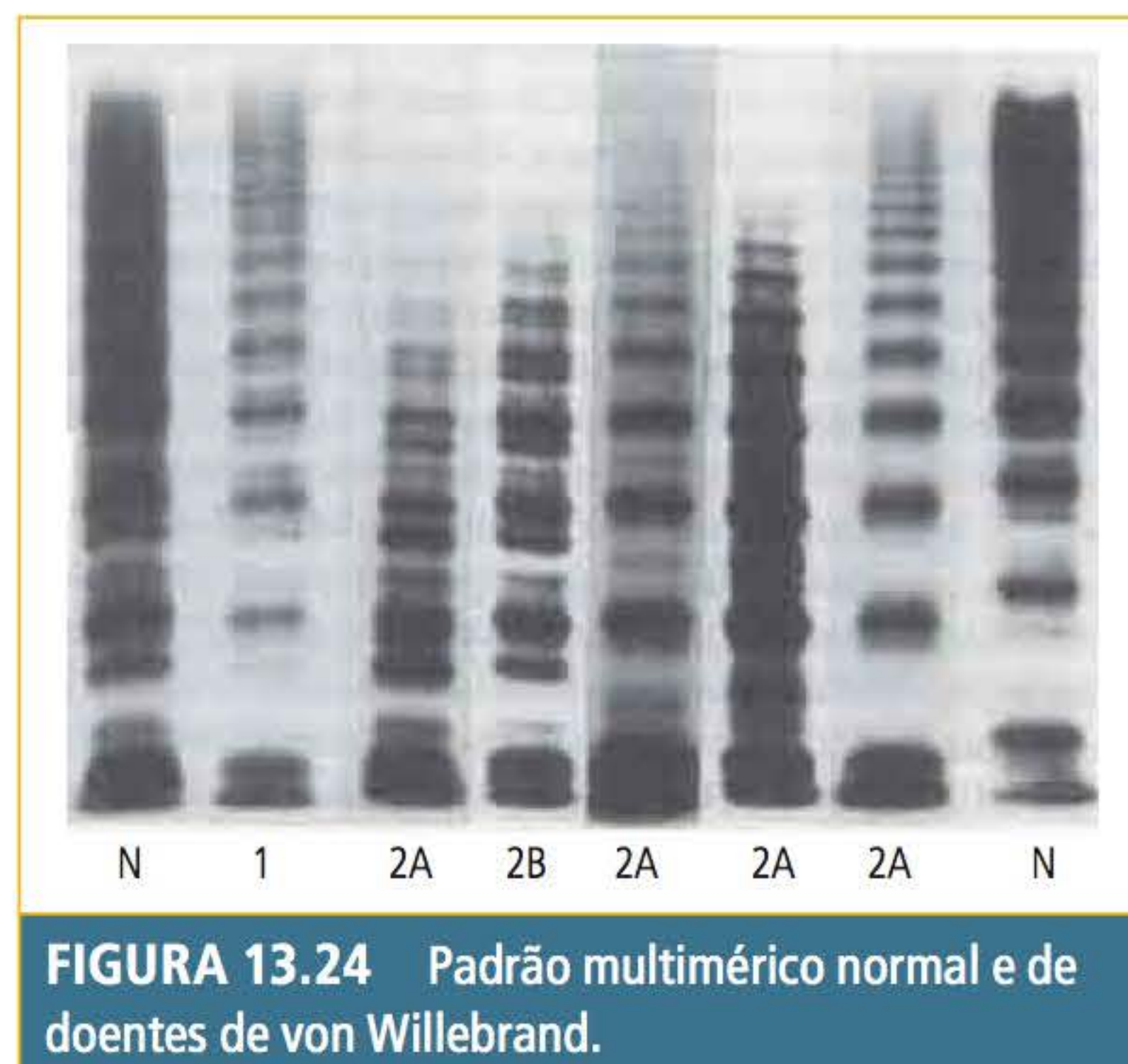


É muito importante a avaliação plaquetária na doença de von Willebrand, porquê, apesar de a contagem de plaquetas apresentar um número normal, elas não são funcionais. A plaqueta perde a função de adesão pela falta do fvW; se as plaquetas de um doente de von Willebrand forem transfundidas a uma pessoa normal (sem deficiência de fvW), elas funcionam normalmente (adesão e agregação). A morfologia plaquetária também é normal. O TS está alterado, mas a literatura questiona o valor do TS como um teste de triagem.<sup>12</sup> O problema com o TS é técnico: o teste deve ser realizado corretamente e por profissional ou técnico bem-treinado (ver Avaliação da hemostasia primária). O TTPa pode estar alterado, e o TP, normal. Quando o paciente apresenta esse perfil laboratorial, deve-se pensar em dvW.

Nos testes específicos, mede-se a atividade do fator VIII por curva de calibração com plasma deficiente nesse fator e, com isso, determina-se a sua porcentagem de atividade. O nível de atividade do fator VIII está diminuído na doença de von Willebrand porque ele circula complexado ao fvW, o que prolonga sua meia-vida, estabiliza sua atividade, torna-o mais suscetível à ação da trombina e inibe a ação proteolítica do complexo proteína C-S (ver Cofatores solúveis – Fator VIII). O antígeno do fvW pode ser medido por ELISA empregando anticorpos contra o fvW.

Nos testes discriminatórios, faz-se a curva de agregação plaquetária usando como agente agregante a ristocetina, e a separação, usando eletroforese em gel, dos multímeros do fvW. Adicionar ristocetina a um plasma rico em plaquetas, com concentração normal do fvW, leva à ligação do fvW à glicoproteína GPIb (expressa na membrana plaquetária) com consequente agregação plaquetária.<sup>2,26</sup> Para o diagnóstico da dvW, a agregação plaquetária pode ser realizada de duas maneiras: a primeira é adicionar ao plasma do paciente plaquetas liofilizadas (plaquetas exógenas) e uma concentração fixa de ristocetina e medir a agregação plaquetária. A segunda é fazer uma agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA, do inglês *ristocetin induced platelet aggregation*),<sup>2</sup> que consiste em adicionar ao plasma do paciente concentrações crescentes de ristocetina e medir a agregação plaquetária. Em pessoas normais, a curva de agregação é ausente ou subagregante em concentrações de ristocetina entre 0,3 a 0,5 mg/mL e tem uma curva agregante na concentração de 1,2 mg/mL de

ristocetina.<sup>2</sup> O padrão multimérico do fvW pode ser evidenciado pela eletroforese em gel; em indivíduos normais, não há deficiência de nenhum multímero, e observam-se todas as bandas. A **Figura 13.24** mostra o padrão multimérico normal e o de doentes de von Willebrand.



**FIGURA 13.24** Padrão multimérico normal e de doentes de von Willebrand.

Fonte: Adaptada da Lichtman e colaboradores.<sup>12</sup>

O sangramento na dvW pode simular um quadro de disfunção plaquetária ou de hemofilia A. A deficiência do fator VIII ocorre tanto na hemofilia A como na dvW. Pacientes com hemofilia A que fizeram uso de ácido acetilsalicílico ou que têm uma disfunção plaquetária podem ter uma combinação de sangramentos que simule um quadro de dvW do tipo 3.<sup>2</sup> Na hemofilia, o antígeno do fvW e a agregação plaquetária utilizando plaquetas exógenas estão normais e, no subtipo 3, o antígeno do fvW está ausente e não há agregação plaquetária com plaquetas exógenas.<sup>2</sup> O padrão de herança deve ser determinado, quando possível, porque um padrão compatível com herança ligada ao sexo confirma a hemofilia.<sup>2</sup> A trombocitopenia está associada com a dvW do tipo 2B e podem ocorrer contagens de plaquetas abaixo de 20.000 plaquetas/ $\mu$ L;<sup>2</sup> muitas vezes, nessa situação, faz-se o diagnóstico errado de trombocitopenia autoimune.<sup>2</sup>

## COAGULOPATIAS ADQUIRIDAS

As coagulopatias adquiridas podem ser causadas por deficiência da vitamina K, doença hepática, inibidores da coagulação (anticorpos), coagulopatias induzidas por medicamentos, síndrome antifosfolípídeo e coagulação intravascular disseminada (CIVD).<sup>3</sup>



### Deficiência da vitamina K

A vitamina K (VK) é muito importante na carboxilação de fatores dependentes dela – fatores II, VII, IX e X –, além de duas proteínas regulatórias da coagulação sanguínea, as proteínas S e C.<sup>2</sup> Existe, portanto, uma relação direta entre a coagulação sanguínea e os níveis de vitamina K; sem vitamina K, ou na deficiência dela, tem-se uma doença hemorrágica. A vitamina K é encontrada em vegetais verdes, derivados do leite e fígado. Além da fonte exógena (dieta) de VK, tem-se uma produção endógena: as bactérias da flora intestinal normal sintetizam a VK,<sup>1</sup> que é absorvida em pequena quantidade pelo íleo.<sup>2</sup> Para que a VK seja absorvida, necessita que as funções pancreática e biliar sejam normais.<sup>1</sup> Nosso organismo estoca pequenas quantidades de VK no tecido hepático, que é rapidamente consumido (uma semana)<sup>2</sup> caso a ingesta seja insuficiente.

A deficiência da VK está presente em quadros de má-absorção intestinal por doenças do trato biliar.<sup>1</sup> Determinados antibióticos, doença hepática e administração de anticoagulantes orais, como varfarina e dicumarínicos, interferem no ciclo da VK, impedindo, desse modo, a carboxilação dos fatores da coagulação dependentes de VK.<sup>1</sup>

Todo paciente icterico por hepatopatia tem como solicitação laboratorial o TP. Isso se deve ao fato de o dano celular hepático interferir no ciclo da VK e, assim, impedir a ativação dos fatores da coagulação dependentes de VK; o aumento do TP indica que a deficiência da VK está ocorrendo ou por má-absorção da vitamina K ou por grave dano hepatocelular.<sup>1</sup>

O recém-nascido (RN) é particularmente sensível à deficiência da vitamina K, pois seu intestino é estéril e não sintetiza essa vitamina. Seu estoque de VK é muito baixo, porque a quantidade de vitamina que cruza a placenta é pequena, e o leite materno é uma fonte pobre de VK.<sup>1</sup> O nível plasmático de VK no RN é baixo nos primeiros 2 a 5 dias de vida; esse nível se eleva a partir da primeira semana, atingindo níveis de adulto após três meses.<sup>1</sup> O RN pode ter uma doença hemorrágica causada por deficiência de VK que, em geral, ocorre entre o 2º e o 7º dia de vida<sup>1</sup> e tem como sinais clínicos sangramentos na pele e em mucosas e em sítios de punção venosa;<sup>27</sup> podem ocorrer sangramentos intracranianos e retroperitoneais.<sup>1</sup> Como prevenção da doença hemorrágica por deficiência da VK no RN, é feito o uso profilático de VK.<sup>1</sup>

Na deficiência da VK, o TP e o TTPa estão aumentados devido à deficiência específica dos fatores II, VII, IX e X; o tempo de sangramento e a contagem de plaquetas estão normais. Quando se suspeita de doença hemorrágica do RN por deficiência da VK, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada.<sup>1</sup> Na última, todos os fatores estão diminuídos, todos os testes de coagulação estão prolongados e tem-se a presença anormal dos produtos de degradação do fibrinogênio e/ou da fibrina (PDF).<sup>1</sup>

### Doença hepática

As doenças hepáticas que cursam com alteração dos fatores de coagulação são necroses hepatocelulares agudas (hepatite viral, hepatite medicamentosa), doenças hepatocelulares crônicas, hepatite alcoólica, cirrose hepática e icterícia obstrutiva.<sup>1</sup>

A relação que existe entre as doenças hepáticas e a coagulação é explicada pelo fato de os fatores de coagulação serem produzidos exclusivamente no fígado, com exceção do fator VIII. Nessas situações, o melhor exame para avaliar a função hepática é o TP porque ele mede os fatores II, VII, IX e X, os quais são dependentes de vitamina K. Caso o TP não seja corrigido pela administração parenteral de vitamina K, a doença hepática é de mau prognóstico.<sup>1</sup>

Pacientes com doença hepática crônica podem desenvolver coagulação intravascular disseminada. Quando isso ocorre, a dificuldade em se controlar esse processo se dá porque os níveis de proteína C, proteína S e antitrombina estão diminuídos, o fígado perde a capacidade de clarear os fatores ativados da coagulação e também não consegue repor os fatores consumidos.<sup>1</sup> A fibrinólise torna-se excessiva porque não há o controle hepático sobre ela.<sup>1</sup> Esses pacientes apresentam TP e TTPa aumentados, fatores II, VII, IX, X, proteína C, proteína S e antitrombina diminuídos, fator VIII aumentado e fibrinogênio diminuído. As plaquetas estão diminuídas em número e com agregação plaquetária deficiente, o que acarreta um aumento no tempo de sangramento.<sup>1</sup>

### Inibidores da coagulação (anticorpos)

Os inibidores adquiridos da coagulação sanguínea são proteínas que inibem os fatores da coagulação ou interferem nas reações em que eles estão envolvidos.<sup>2</sup> A maioria é caracterizada como



anticorpos e surge na circulação a partir de transfusões de proteínas plasmáticas em portadores de doenças hemorrágicas hereditárias, podendo-se fazer presentes em pacientes com hemostasia normal.<sup>2</sup> Estão descritos inibidores para os fatores VIII, V, VII, IX, X, II, XI, XII, I, fator de von Willebrand, fatores que afetam a polimerização e estabilização da fibrina, anticoagulante do tipo heparina e anticoagulante lúpico.<sup>2</sup>

Os inibidores do fator VIII caracterizam-se por neutralizar a atividade desse fator<sup>2</sup> e estão descritos em cinco situações clínicas: na hemofilia A (aloanticorpos inibidores do fator VIII), no pós-parto, associado a doenças imunológicas, associado a doenças malignas e em pacientes idosos sem nenhuma doença.<sup>2</sup> As doenças imunes associadas com inibidores do fator VIII são artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, asma brônquica, doença inflamatória do intestino delgado, doença do enxerto *versus* hospedeiro e na terapia com interferon- $\alpha$ .<sup>28-30</sup> Os inibidores do fator VIII podem ocorrer no pós-parto,<sup>31</sup> mas raramente ocorrem durante a gestação<sup>32</sup> e, na maioria das pacientes, o inibidor desaparece espontaneamente após 12 a 18 meses.<sup>31</sup> Alguns medicamentos (penicilina, antibióticos à base de sulfa, clorpromazina e fenitoína) estão associados com a produção de inibidores do fator VIII.<sup>1</sup>

Os inibidores do fator VIII, na maioria dos casos, são imunoglobulinas da classe IgG,<sup>1,2</sup> específicos contra a atividade do fator VIII e não interferem com a atividade do fator de von Willebrand.<sup>2</sup> Estão presentes em 5 a 20% dos hemofílicos.

O TP e o TT são normais, e o TTPa está alterado. Um teste simples para se avaliar a presença de inibidores do fator VIII consiste em misturar, em proporções iguais, plasma normal com plasma do paciente e fazer o TTPa; se houver correção do TTPa, não há presença de inibidores; caso o TTPa não corrija, é indicativo de presença de inibidores. Os testes feitos na mistura de plasmas (paciente+normal) devem ser realizados logo após a mistura dos dois plasmas e após duas horas de incubação a 37 °C, para se distinguir entre os inibidores de ação imediata (anticoagulante lúpico) e inibidores tempo-dependente (inibidores do fator VIII).

A quantificação do inibidor do fator VIII é dada em uma unidade-padrão chamada de unidade Bethesda;<sup>33</sup> a quantificação do inibidor deve ser feita em situações de emergência (episódio hemorrágico) e para a avaliação do tratamento.<sup>2</sup>

## Síndrome antifosfolípideo (SAF)

Neste tópico (SAF), será apresentada uma revisão sobre síndrome antifosfolípideo feita por Mariana Bodnar, em 2012.<sup>34</sup>

A síndrome antifosfolípideo (SAF), descrita originalmente por Hughes, em 1983,<sup>35</sup> é uma doença autoimune, adquirida, caracterizada laboratorialmente pela presença de níveis elevados de anticorpos antifosfolípeos (anticoagulante lúpico, anticardiolipina ou a anti- $\beta$  2 glicoproteína I). É classificada como primária quando não há evidências de outra doença associada ou secundária quando existe outra patologia associada, principalmente o lúpus eritematoso sistêmico (LES).

Caracteriza-se clinicamente pela ocorrência de trombose venosa e/ou arterial e complicações obstétricas. É a mais comum das trombofilias adquiridas. Outras manifestações clínicas, como embolia pulmonar, infarto do miocárdio, lesões de válvulas cardíacas, anemia hemolítica e trombocitopenia, são também encontradas na SAF. Livido reticular e ulcerações cutâneas são as manifestações dermatológicas de maior frequência.

Os anticorpos antifosfolípeos constituem uma família de autoanticorpos, que apresenta uma variedade de alvos específicos, reconhecendo combinações de fosfolípeos, proteínas plasmáticas ligadas a fosfolípeos ou ambos. As classes IgM e/ou IgG são as mais comuns, sendo o tipo IgA o menos encontrado.

A detecção dos anticorpos anticardiolipina e anti- $\beta$ <sub>2</sub>GPI é realizada por testes imunoenzimáticos (ELISA) em fase sólida, enquanto a pesquisa do anticoagulante lúpico é realizada por testes de coagulação dependentes de fosfolípeos.

Para se estabelecer o diagnóstico de SAF, segundo o último consenso realizado em Sydney, Austrália, em 2006,<sup>36</sup> é necessária a presença de um evento clínico acompanhado de altos títulos de anticorpos antifosfolípeos. Os testes laboratoriais positivos devem ser repetidos com intervalo de 12 semanas para excluir anticorpos antifosfolípeos transitórios, que muitas vezes aparecem secundariamente a processos infecciosos.

## Histórico

O anticorpo antifosfolípideo foi detectado pela primeira vez em 1906, por Wassermann e colaboradores,<sup>37</sup> em pacientes com sífilis. Esse anticorpo reagia com extratos de coração bovino e foi identificado, em 1941 por Pangborn, como uma cardiolipina que é um fosfolípido mitocondrial



carregado negativamente e presente na composição das membranas celulares.

As combinações de cardiolipina juntamente com lecitina e colesterol formaram a base para o reagente da pesquisa do VDRL (do inglês *veneral disease research laboratory*), que é o teste de triagem para detecção da sífilis. Após o desenvolvimento de testes mais específicos, como a pesquisa do *Treponema pallidum*, observou-se que havia indivíduos VDRL positivo sem qualquer evidência de sífilis; essa característica, falso-positiva, foi posteriormente encontrada em pacientes com LES.

Para a detecção mais sensível dos anticorpos anticardiolipina, Harris e colaboradores<sup>38</sup> desenvolveram um teste quantitativo em fase sólida, em que é utilizada a cardiolipina como antígeno (ELISA).

O início da identificação do anticoagulante circulante ocorreu em 1952, por Conley e Hartmann,<sup>39</sup> apresentando a capacidade de prolongar os testes de coagulação fosfolipídeos dependentes em pacientes com LES.

Apenas em 1972, foi proposto o termo anticoagulante lúpico para esse anticorpo.

No ano de 1983, Hughes<sup>35</sup> descreveu casos de trombose venosa e arterial associados à presença de anticoagulante circulante; a partir daí, a patologia recebeu o nome de síndrome antifosfolipídeo.

No início de 1990, dois grupos de pesquisadores<sup>40</sup> descobriram que alguns anticorpos anticardiolipina necessitam da presença, no plasma, de uma proteína ligante de fosfolipídeos (anti- $\beta_2$ GPI) para se ligar à cardiolipina.

### Etiologia

O aparecimento de anticorpos antifosfolipídeos em pacientes portadores da SAF ainda não é completamente compreendido. Sabe-se que essa síndrome se enquadra na categoria de doenças autoimunes, e alguns eventos estão associados com o seu aparecimento.

Infecções virais, como HIV, hepatites do tipo A, B e C, citomegalovírus, varicela, Epstein-Barr, adenovírus e parvovírus B<sub>19</sub>, estão associadas com um aumento na incidência desses anticorpos. A utilização de drogas, como fenotiazina, procainamida, hidralazina, quinidina, valproato e fenitoína, também está relacionada com o aparecimento desses anticorpos.

Esses anticorpos podem, também, surgir em decorrência de um fator genético. Pacientes portadores de lúpus e anticorpos antifosfolipídeos têm

uma incidência maior de HLA DR3, DR4, DR7 e Dww53, assim como de alelos nulos para C4. Pacientes portadores da síndrome primária apresentam uma incidência maior de DR7.

A apoptose celular com a consequente exposição de fosfolipídeos aniônicos na superfície da célula tem sido também apontada como um fator para a geração de anticorpos antifosfolipídeos.

### Patogênese

As manifestações clínicas mais evidentes da SAF são a presença de trombozes venosas e/ou arteriais. Hipóteses têm sido apresentadas para explicar os mecanismos pelos quais os anticorpos antifosfolipídeos induzem esses eventos, que apresentam grande importância clínica para o diagnóstico da síndrome.

A primeira hipótese é relacionada à ativação das células endoteliais pela ligação dos anticorpos antifosfolipídeos, o que promove um aumento da expressão de moléculas de adesão e da secreção de citocinas, interferindo na liberação endotelial de prostaciclina.

Uma segunda hipótese supõe que o estresse oxidativo provoca lesão no endotélio do vaso, pela ação da LDL oxidada, que seria digerida pelo macrófago, provocando ativação e consequente dano celular.

A terceira sugere que os anticorpos antifosfolipídeos interferem na função das proteínas ligadoras de fosfolipídeos envolvidas no processo da coagulação, como a  $\beta_2$ -glicoproteína I, um importante cofator, que tem seu efeito de anticoagulante natural afetado pela ligação com os fosfolipídeos, passando a expressar efeito contrário, isto é, predispondo o paciente a um estado de hipercoagulabilidade. Outras proteínas envolvidas na regulação do processo de coagulação, como protrombina, proteínas C e S e anexina V, podem também ser alvo dos anticorpos antifosfolipídeos.

### Epidemiologia

A prevalência de anticorpos antifosfolipídeos varia de 1 a 5% na população saudável e, em geral, tende a aumentar com o passar da idade, especialmente em pacientes com doença crônica anterior. Existe uma influência sazonal na presença desses anticorpos em populações saudáveis, ocorrendo maior prevalência nos meses de inverno do que do verão.

A SAF afeta principalmente jovens e adultos, podendo se apresentar também em crianças e idosos. As mulheres, em especial aquelas em idade fértil, de 15 a 50 anos, são as mais afetadas, sendo, nesse caso,



principalmente portadoras da SAF secundária. Cerca de 80% dos pacientes com SAF são mulheres.

Entre 12 a 30% dos pacientes com LES apresentam anticorpos anticardiolipina (aCL), e de 15 a 34% apresentam anticoagulante lúpico (AL). Em pacientes que apresentam altos títulos desses anticorpos, 38% deles são portadores de ambos os anticorpos. Pacientes com SAF geralmente possuem deficiência da proteína S.

### Principais manifestações clínicas

A trombose é a manifestação clínica mais comum da SAF e pode afetar vasos de qualquer órgão. A trombose venosa, principalmente a que atinge os membros inferiores, ocorre em 55% dos pacientes, e metade deles apresenta embolia pulmonar. A trombose arterial afeta o cérebro em 50% dos casos, provocando acidentes vasculares. Outros locais afetados são coração, olhos, rins e artérias periféricas. Uma proporção de 90% dos pacientes que apresentam acidentes isquêmicos transitórios, com idade inferior a 50 anos, são portadores de anticorpos antifosfolídeos. Em um estudo realizado por Quaio e colaboradores,<sup>41</sup> a prevalência de trombose arterial foi maior em pacientes que apresentam a SAF primária.

As principais manifestações hematológicas incluem a trombocitopenia, anemia hemolítica com Coombs direto positivo e síndrome de Evans. A contagem de plaquetas abaixo de 100.000 plaquetas/ $\mu$ L está presente em 90% dos pacientes com LES, que apresentam títulos de anticoagulante lúpico e anticorpo anticardiolipina. Autoanticorpos contra glicoproteínas de plaquetas têm sido associados à trombocitopenia em pacientes com anticorpos antifosfolídeos. A trombocitopenia em pacientes portadores de HIV está associada à presença de anticorpos antifosfolídeos em 70 a 80% dos casos. Pacientes portadores de HIV ou HCV possuem alta incidência de anticorpos antifosfolídeos, porém, raramente apresentam eventos trombóticos associados. A presença de anticorpos anticardiolipina do tipo IgA tem sido associada com a trombocitopenia, enquanto a presença do tipo IgM é relacionada à anemia hemolítica.

A perda fetal é uma manifestação clínica de grande importância para pacientes do sexo feminino. Entre as pacientes com perda fetal recorrente, cerca de 16 a 38% delas são portadoras de anticorpos antifosfolídeos.

O risco de aborto em mulheres portadoras de anticorpos antifosfolídeos é maior a partir da

10ª semana de gestação, o que contrasta com o que geralmente ocorre, que é a perda fetal nas primeiras nove semanas. O anticorpo que tem maior prevalência na perda fetal, em pacientes com LES, é a anticardiolipina do tipo IgG. Há também evidências de que essas gestantes podem dar à luz prematuramente.

As principais complicações em pacientes gestantes portadoras de anticorpos antifosfolídeos incluem, além da perda fetal, pré-eclâmpsia, insuficiência placentária, trombose materna, incluído, nessa última, o acidente vascular cerebral.

As manifestações dermatológicas são, geralmente, frequentes e precoces; em 41% dos portadores de SAF, podem ser o primeiro sinal da síndrome, sendo o livedo reticular e as úlceras cutâneas as principais manifestações. O livedo reticular é caracterizado por lesões vasculares purpúricas e mosqueadas, provavelmente secundário à trombose de pequenos vasos, porém não é exclusividade da SAF.

Já as úlceras cutâneas aparecem nas extremidades e, geralmente, deixam cicatrizes atróficas. Os anticorpos anticardiolipina do tipo IgA estão associados a úlceras cutâneas e vasculites.

A SAF catastrófica é uma variante da SAF e foi descrita pela primeira vez por Asherson, em 1992.<sup>42</sup> Pacientes com esse tipo de complicação representam menos de 1% de todos os pacientes com SAF. Caracteriza-se clinicamente pelo envolvimento de pelo menos três órgãos, causando a eles rápida falência devido à trombose generalizada; o desenvolvimento dos sintomas ocorre em um período que varia de dias a semanas. A mortalidade nesses casos fica é de cerca de 50%, devido a lesões generalizadas em múltiplos órgãos. Afeta vasos de grande e pequeno calibre. Nos últimos, gera uma microangiopatia trombótica, que afeta pulmões, rins, sistema nervoso central, pele e coração.

Vários fatores podem estar associados ao início da SAF catastrófica, como infecções, procedimentos cirúrgicos, interrupção com tratamento de anticoagulantes, contraceptivos orais e neoplasias.

Os pacientes podem desenvolver a SAF catastrófica, ou síndrome de Asherson, como também é conhecida, de forma inicial, sem qualquer história prévia de trombose associada à SAF primária ou LES. Laboratorialmente, evidencia-se trombocitopenia em 60% dos casos, hemólise em um terço dos pacientes, e 20% deles com algumas características de CIVD. Deve-se fazer diagnóstico diferencial com púrpura trombocitopênica



trombótica, coagulação intravascular disseminada e síndrome hemolítico-urêmica.

Classificação e critérios de diagnóstico

A SAF deve ser suspeitada quando o paciente apresenta episódios de trombose sem fatores de risco evidentes. Nesse caso, é sugerida a pesquisa laboratorial dos anticorpos antifosfolípeos, que inclui VDRL, anticorpos anticardiolipina, fosfatidilserina, anti-β<sub>2</sub>GPI e testes de coagulação para triagem de anticoagulante lúpico.

Pode ser classificada em primária, quando ocorre na ausência de uma doença autoimune comitente, ou secundária, quando é associada principalmente à existência de LES. No entanto, além do LES, a SAF pode aparecer em decorrência de doenças infecciosas, como sífilis, hepatite C e HIV, utilização de algumas drogas e neoplasias. Em geral, as manifestações clínicas das síndromes antifosfolípeos são semelhantes para as formas primárias e secundárias.

O diagnóstico da SAF pode ser difícil devido à grande variedade de manifestações clínicas além da trombose, que é a manifestação clássica da SAF. Recentemente, a International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) apresentou um consenso para classificação da SAF, que foi realizada em Sapporo, no Japão, em 1999, e ficou conhecida como Critérios de Sapporo.<sup>36</sup> Nesse consenso, ficou estabelecido que o paciente deve apresentar um evento clínico, como trombose ou perda fetal, demonstrar a presença laboratorial de anticorpos anticardiolipina IgG/IgM e/ou anticoagulante lúpico, que devem ser detectados em duas ocasiões com seis semanas de intervalo. Essa classificação resultou em uma sensibilidade de 71% e uma especificidade para a detecção correta da SAF de 98%.

Em 2006, em Sydney (Austrália), foi realizada uma revisão nos Critérios de Sapporo e definiram-se novos critérios laboratoriais (Quadro 13.1).<sup>43</sup>

Incluiu-se a pesquisa de anticorpos anti-β<sub>2</sub>GPI (IgM e IgG) pelo método de ELISA e a elevação dos valores de corte para os anticorpos anticardiolipina IgM e IgG, sendo necessários títulos moderados ou altos, que significam acima de 40 unidades para IgG ou IgM, detectados em duas ocasiões com um intervalo, agora, de 12 semanas. Os critérios clínicos não foram alterados, permanecendo a ocorrência de trombose vascular e/ou morbidade gestacional.

Outras manifestações clínicas, como trombocitopenia, livedo reticular e doenças de valvas cardíacas, entre outras, são de grande importância, porém não foram incluídas nos critérios de diagnóstico definidos pelo Consenso.

A ausência de anticoagulante lúpico ou anticorpo anticardiolipina em pacientes com suspeita de SAF não necessariamente descarta seu diagnóstico. Outros antifosfolípeos (anticardiolipina tipo IgA, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina) ou anticorpos contra proteínas que se ligam a fosfolípeos, como antitrombina e antianexina V, são fatores que, embora não façam parte dos critérios de diagnóstico, podem ser de grande utilidade prática.

QUADRO 13.1 Critérios de classificação revisados em Sydney

CRITÉRIOS CLÍNICOS
<b>1. Trombose vascular</b> Um ou mais episódios de trombose arterial, venosa ou de pequenos vasos ocorrendo em qualquer órgão ou tecido e confirmados por exames de imagem ou histopatológicos
<b>2. Morbidade gestacional</b> 2.1 Uma ou mais mortes inexplicáveis de feto morfollogicamente normal com mais de 10 semanas de gestação; ou 2.2 Um ou mais nascimentos prematuros de feto morfollogicamente normal com 34 semanas ou menos em virtude de pré-eclâmpsia, eclâmpsia ou retardo do crescimento uterino; ou 2.3 Três ou mais abortamentos espontâneos consecutivos antes da 10ª semana de gestação com exclusão de causas cromossômicas, anatômicas ou hormonais
CRITÉRIOS LABORATORIAIS
<b>1. Anticorpo anticoagulante lúpico</b> Presente no plasma em duas ou mais ocasiões com intervalo de 12 semanas, detectado de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia
<b>2. Anticorpo anticardiolipina</b> Presença no soro ou plasma do anticorpo IgG ou IgM, em títulos moderados ou elevados > 40 unidades G ou M, ou > 99º percentil, em duas ou mais ocasiões separadas por 12 semanas, dosadas por ELISA
<b>3. Anti-β<sub>2</sub>GPI</b> Presença no soro ou plasma do anticorpo IgG ou IgM, em títulos moderados ou elevados > 99º percentil, em duas ou mais ocasiões separadas por 12 semanas, dosadas por ELISA

Fonte: Deweese e Hoylaerts.<sup>43</sup>

Diagnóstico laboratorial dos anticorpos antifosfolípeos

Os anticorpos anticardiolipina são detectados por testes imunoenzimáticos (ELISA), que utilizam



cardiolipina como antígeno, na presença de  $\beta_2$ GPI sérica bovina. Segundo o último consenso em Sydney para o diagnóstico da SAF,<sup>36</sup> ficou estabelecido que é necessária a presença de anticorpos anticardiolipina do tipo IgG ou IgM, no soro ou plasma, em níveis moderados a altos, acima de 40 unidades ou acima de 99º percentil, em duas ou mais ocasiões separadas por um intervalo de 12 meses. A presença de títulos baixos ou moderados, de anticorpos anticardiolipina, pode ser transitória e aparecer como resultado de infecções; por isso, a importância de sua repetição para confirmação. Muitos pacientes com SAF podem ser identificados a partir do VDRL, por ele apresentar a cardiolipina como seu principal componente antigênico. Porém, o VDRL não tem valor diagnóstico devido à baixa sensibilidade e especificidade, entretanto, pode servir como sinal de alerta para posteriores triagens.

A presença de títulos moderados a altos de anticardiolipina, principalmente da classe IgG, está altamente relacionada a manifestações clínicas, sendo a subclasse IgG2 mais associada a eventos trombóticos. Já os anticorpos anticardiolipina do tipo IgM tendem a dar resultados falso-positivos, principalmente quando em níveis baixos e, em especial, na presença de fator reumatoide ou de crioglobulinas.

Os anticorpos anti- $\beta_2$ GPI são detectados pela técnica de imunoensaio (ELISA), as placas são revestidas com  $\beta_2$ -glicoproteína humana. A dosagem de anti- $\beta_2$ GPI, no soro ou plasma, deve apresentar resultado superior ao 99º percentil, em duas ou mais ocasiões, separadas por um intervalo de 12 semanas, e detectadas por metodologia de ELISA padronizado. Sua detecção está associada à alta especificidade para SAF, porém com baixa sensibilidade e, por isso, a dosagem da anti- $\beta_2$ GPI não deve ser utilizada de forma isolada e sim em associação com a pesquisa de anticorpos anticardiolipina. No entanto, uma porcentagem de 3 a 10% dos pacientes com SAF pode apresentar a anti- $\beta_2$ GPI como único teste positivo. Essa dosagem se reveste de grande utilidade em pacientes com anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico negativos, mas com evidência clínica de SAF. Altos títulos de anti- $\beta_2$ GPI estão fortemente associados à trombose e outras manifestações da SAF. É considerada como o principal cofator para os anticorpos anticardiolipina.

O anticoagulante lúpico (AL) pertence a um grupo heterogêneo de anticorpos que são dirigidos

contra fosfolípidos de carga negativa ou contra complexos formados entre fosfolípidos e proteínas ( $\beta_2$ GPI ou protrombina). O AL prolonga os testes de coagulação fosfolípidos dependentes, comportando-se como um inibidor adquirido da coagulação. Essa atividade do anticoagulante lúpico foi descrita pela primeira vez em 1952, por Conley e Hartmann.<sup>39</sup> Embora a denominação seja anticoagulante lúpico, sua presença não é restrita a pacientes com LES.

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção do fenômeno AL, incluindo o TTPa, o TCK (tempo de coagulação com o Kaolin) e o dRVVT (*dilute Russels viper venom time*). Devido à natureza heterogênea do AL, é necessária a realização de mais de um tipo de teste para o diagnóstico correto. Geralmente, são realizados dois ou mais testes para rastreio, o que evita resultados falso-positivos, pois nenhum deles tem sensibilidade de 100%.

Entre os testes citados, o dRVVT é considerado o mais sensível para a pesquisa do AL; isso explica sua ampla utilização nos EUA e na Europa. Thiagarajan e colaboradores<sup>44</sup> foram os primeiros a descrever o uso de dRVVT modificado para a triagem de AL. O dRVVT ativa diretamente o fator X da coagulação com formação de um coágulo de fibrina; o teste se prolonga na presença do AL porque interfere na estruturação do complexo protrombinase.

O AL é a causa de prolongamento do TTPa especialmente em pacientes sem histórico de sangramentos. Por esse motivo, o TTPa é considerado um bom teste de triagem para a pesquisa do AL, porém sua sensibilidade em pacientes portadores da SAF é de cerca de 30 a 40%, o que pode resultar em valores normais, mesmo sendo o paciente portador de SAF.

A metodologia para detecção do anticoagulante lúpico é dividida em etapas: na primeira, é observado o prolongamento do tempo de formação do coágulo em pelo menos um teste de coagulação fosfolípido dependente *in vitro*. O plasma utilizado para a pesquisa do anticoagulante lúpico, nos testes de coagulação fosfolípido dependente, deve ser pobre em plaquetas. Para isso, o correto é fazer a dupla centrifugação do plasma para evitar a contaminação com plaquetas, pois a presença das plaquetas, no plasma, pode neutralizar o AL, resultando em teste falso-negativo.

A segunda etapa consiste em caracterizar a atividade inibitória do anticorpo pela mistura do



plasma do paciente com um *pool* de plasma normal. Os testes realizados com essa mistura de plasma devem acontecer após duas horas de incubação a uma temperatura de 37°C, o que é útil para distinguir os inibidores de ação imediata e os inibidores tempo dependentes. O anticoagulante lúpico é um inibidor tempo dependente. Caso o tempo de coagulação dos testes (TTPa) não seja corrigido, após a mistura dos plasmas do paciente+plasma normal, fica caracterizada a presença do anticoagulante lúpico.

A presença de AL é considerada mais específica e preditiva para ocorrência de trombose quando comparada com ensaios do tipo ELISA para anticorpos anticardiolipina, sendo também associada a perdas fetais.

No mercado, existem, à disposição dos laboratórios, painéis para o diagnóstico da síndrome antifosfolípido, nos quais se incluem testes coagulométricos, por quimioluminescência e por ELISA. Tais testes podem ser encontrados, por exemplo, no site WerfenLife Group Headquarters.<sup>45</sup>

### Coagulação intravascular disseminada (CIVD)

A CIVD está associada a uma série de patologias, as quais podem ser divididas em agudas ou subagudas e crônicas.<sup>2</sup> As patologias agudas e subagudas associadas com CIVD são processos infecciosos por bactérias gram-negativas ou gram-positivas, viroses (varicela),<sup>2</sup> complicações obstétricas, rompimento de placenta, septicemia, leucemias, linfomas, lesão tecidual, queimaduras e infarto do miocárdio. As patologias crônicas associadas a CIVD são tumores sólidos, complicações obstétricas, morte fetal, aneurisma de aorta, hemangiomas e doença hepática avançada.

Uma série de doenças pode ocasionar hemorragias e alterações dos exames laboratoriais que avaliam a hemostasia e que não estão associadas com CIVD.<sup>2</sup> Um exemplo é a trombocitopenia, que pode ser causada por um problema de produção plaquetária na medula óssea, como consequência de uma leucemia, por ativação da plaqueta pela célula endotelial, como na púrpura trombocitopênica trombótica, ou por destruição imunológica.<sup>2</sup> Uma septicemia sem CIVD está associada a vários graus de trombocitopenia, mas, de modo geral, uma septicemia com uma contagem de plaquetas abaixo de 50.000 plaquetas/ $\mu$ L está associada à CIVD.<sup>46</sup>

As infecções são causas comuns de CIVD aguda. As bactérias gram-negativas estão mais

comumente associadas à septicemia e CIVD do que as gram-positivas. Em princípio, qualquer bactéria gram-negativa é capaz de causar CIVD e, entre as gram-positivas, as bactérias que estão associadas com CIVD são as capsuladas, como os pneumococos.<sup>2</sup> Os vírus também podem causar CIVD, entre eles o vírus da rubéola, varicela e *influenza*.<sup>2</sup> A *Mycobacterium tuberculosis*, infecções por fungos e malária podem ser causas de CIVD.<sup>2</sup>

O mecanismo pelo qual as bactérias desencadeiam um quadro de CIVD é devido à liberação de endo (lipopolissacarídeos – LPS) ou exotoxinas (leucocidinas, hemolisinas, hialuronidases, coagulases e fibrinolisinases).<sup>1</sup> Essas toxinas degradam componentes teciduais e lesam as células endoteliais dos vasos sanguíneos. A célula endotelial torna-se ativada e expressa, em sua superfície, o fator de von Willebrand, ao qual a plaqueta se adere e torna-se ativada, secretando o conteúdo de seus corpos densos e grânulos alfa, mantendo plaqueta ativada. O mastócito secreta o fator ativador de plaquetas (PAF). Assim, a hemostasia primária se faz presente na resposta inflamatória. A célula endotelial ativada também secreta o fator tecidual que ativa o fator VII, que ativa o fator X e o fator IX; é gerada a trombina, e a cascata da coagulação está ativada e se torna autocatalítica. A finalidade é a formação da fibrina a partir da clivagem do fibrinogênio. O fibrinogênio, ou a rede de fibrina formada, funciona como um substrato para interação célula a célula e é uma matriz que modula a resposta inflamatória; a essa rede de fibrina estão associadas, também, as plaquetas ativadas. A toxina bacteriana pode ativar também o fator XII, que inicia a ativação do sistema fibrinolítico, ativa a cascata do complemento, a partir da ativação de C1, e é um mediador da resposta inflamatória, porque aumenta a produção de interleucina-1 (IL-1), por células mononucleares, e de interleucina-6 (IL-6) por neutrófilos. O fator XII ativado transforma a pré-caliceína em caliceína, que libera a bradicinina a partir dos cininogênios de alto peso molecular. A caliceína ativa o fator XII, tornando a sua ativação autocatalítica, é quimiotática para neutrófilos e monócitos e ativa o sistema complemento, especificamente C5. A bradicinina causa contração muscular, vasodilatação e dor. O fator XII ativado também ativa o sistema fibrinolítico, porque a fibrina gerada tem de ser clareada. O sistema fibrinolítico também é ativado a partir dos ativadores teciduais do



plasminogênio secretados por células endoteliais e leucócitos. A geração da plasmina, além de lisar o coágulo e gerar os produtos de degradação da fibrina (PDF), os quais são clareados pelo tecido hepático, ativa o sistema complemento, especificamente C3. Toda resposta inflamatória deve ficar restrita ao sítio inflamatório e não deve passar para uma forma sistêmica. Um dos mecanismos de controle são as células endoteliais que, no sítio inflamatório, têm ação pró-coagulante, mas, fora do sítio, mantêm o fenótipo fisiológico anticoagulante. A CIVD caracteriza-se por ser uma manifestação sistêmica da hemostasia. O balanço entre a ativação da cascata da coagulação e o sistema fibrinolítico é que dá a clínica do paciente; se a ativação da cascata da coagulação for maior que a do sistema fibrinolítico, a característica clínica da CIVD é trombótica. Caso a ativação do sistema fibrinolítico seja maior que a da cascata da coagulação, a característica clínica é hemorrágica.

A CIVD pode ser classificada em aguda e crônica, podendo levar à formação de trombos em diversos órgãos, com consequente falência desses órgãos, ou hemorragias. Geralmente, na CIVD aguda, a hemorragia é a manifestação mais frequente, enquanto na crônica é a formação de trombos.<sup>1</sup>

A CIVD aguda pode ser causada por infecções, leucemias, como a leucemia pró-mielocítica aguda, metástases de neoplasias não hematológicas, eclâmpsia, descolamento prematuro de placenta, traumatismos com liberação de substância óssea, queimaduras e veneno de animais peçonhentos.<sup>1</sup> A CIVD crônica pode ser causada por leucemias, tumores sólidos, aborto retido, síndromes mieloproliferativas, hemoglobinúria paroxística noturna, artrite reumatoide e doenças inflamatórias.<sup>1</sup> A trombose manifesta-se porque a ativação da cascata da coagulação é mais intensa que a ativação do sistema fibrinolítico, enquanto na manifestação hemorrágica a exacerbação maior é do sistema fibrinolítico.

Na CIVD cuja manifestação é trombótica, a ativação da célula endotelial ocorre de modo sistêmico, havendo perda do fenótipo anticoagulante e manifestação sistêmica do fenótipo coagulante. A concentração do fator tecidual ultrapassa o nível do seu inibidor.<sup>1</sup> Os inibidores da coagulação não conseguem inibir a formação da fibrina porque a trombina gerada suplanta-os em quantidade. O sistema fibrinolítico não consegue retirar a fibrina

formada na microcirculação, com consequente formação de trombos em vários órgãos, levando à falência total desses órgãos. Nessa situação, a ativação do mecanismo da coagulação é maior que a ativação do sistema fibrinolítico.

Na CIVD cuja manifestação é a hemorragia, a plasmina está em excesso na corrente circulatória devido à ativação intensa do sistema fibrinolítico.<sup>1</sup> A plasmina impede a formação do coágulo de fibrina porque ela tem como ação a quebra da fibrina e/ou fibrinogênio, formando produtos de degradação do fibrinogênio e/ou fibrina. Além da ação da plasmina sobre o fibrinogênio e a fibrina, ela impede a ação dos fatores V, VII, VIII, IX, X e XIII. Tem ação, também, sobre os inibidores fisiológicos da coagulação, como a antitrombina e proteína C. Nessa situação, pode ocorrer trombocitopenia devido à ação da trombina.

A indicação laboratorial de um quadro de CIVD é dada pelos seguintes resultados:<sup>1</sup> queda do número de plaquetas e, nesse caso, a presença de esquizócitos (associados ou não à hemólise) é uma indicação de microcoágulos, aumento do TP e TTPa por consumo dos fatores da coagulação, diminuição da concentração do fibrinogênio, aumento dos produtos de degradação do fibrinogênio/fibrina (PDF) e presença do D-dímero.

O D-dímero não pode ser muito valorizado caso o paciente tenha trombose venosa profunda (TVP), cirurgia recente ou uma condição inflamatória. A **Tabela 13.2**<sup>47</sup> traz um escore para o diagnóstico laboratorial da CIVD.

TABELA 13.2    Escore para o diagnóstico laboratorial da CIVD	
PRESENÇA DE DOENÇA DE BASE ASSOCIADA COM A CIVD	SEM = ZERO COM = 2
Contagem de plaquetas	> 100.000 = 0 < 100.000 = 1 < 50.000 = 2
D-dímero	Normal = 0 Aumento discreto = 2 Aumentado = 3
TP aumentado	< 3 seg = 0 > 3 < 6 seg = 1 > 6 seg = 2
Concentração do fibrinogênio	> 100 mg/dL = 0 < 100 mg/dL = 1

Fonte: Adaptado de Taylor e colaboradores.<sup>47</sup>



Caso o escore seja  $\geq 5$ , é compatível com CIVD evidente; um escore menor que 5 sugere não ser CIVD, repetir os exames em 1 ou 2 dias. As doenças de base associadas com a CIVD são doenças infecciosas, doenças malignas, complicações obstétricas, doença hepática e trauma ou cirurgia de grande porte.

### INIBIDORES FISIOLÓGICOS DA COAGULAÇÃO – TROMBOFILIAS

A coagulação sanguínea, muitas vezes, é vista como um processo fisiológico com a finalidade de gerar um trombo para cessar uma hemorragia. Isso é verdadeiro, mas a hemostasia está envolvida com a regulação de outros processos fisiológicos, como a resposta inflamatória. A escala evolutiva mostra que nenhum animal consegue sobreviver sem o sistema mononuclear fagocitário (SMF), cujas células são filogeneticamente muito primitivas.<sup>1</sup> O SMF é composto pelos monócitos e seus precursores e pelos macrófagos. Está intimamente relacionado com os granulócitos (eosinófilos, basófilos e neutrófilos) e com os linfócitos. O SMF, os granulócitos e o sistema imunológico constituem uma linha de defesa de nosso organismo. Quando um processo inflamatório agudo se instala devido a qualquer lesão, ocorrem alterações hemodinâmicas e microvasculares, como alteração do calibre vascular, vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular. Essas alterações têm a finalidade de formar um exsudato, um líquido rico em proteínas (complemento e anticorpos) e células (granulócitos, linfócitos e monócitos). Outro tipo de célula que tem uma participação importante na hemostasia é o mastócito, célula residente em tecido, que se localiza ao redor dos vasos sanguíneos. Secrete fator ativador de plaquetas e histamina, que aumenta a permeabilidade vascular e ativa células endoteliais. Quando a célula endotelial está ativada, ela secreta o fator de von Willebrand dos corpos de Weibel Palade e expõe ao sangue circulante o fator tissular. A partir desse ponto, há ativação das hemostasias primária e secundária. O colágeno exposto, após a ativação da célula endotelial, ativa o fator XII. A ativação do XII resulta na ativação da cascata do complemento, ativação do sistema fibrinolítico, aumento da produção de interleucina-1 pelos mononucleares e de interleucina-6 pelos neutrófilos e produção de bradicinina. A resposta inflamatória gera trombina e, conseqüentemente, fibrina. Pelo

fato de a cascata da coagulação ser autocatalítica, é preciso que haja um processo fisiológico que pare a resposta hemostática quando cessa o estímulo que a originou. A fibrina é gerada em situações em que há um estímulo que ative a célula endotelial. Para que a geração de fibrina cesse, tem de haver substâncias que possam impedi-la; tais substâncias são conhecidas como inibidores fisiológicos da coagulação, sem os quais se passa a ter uma predisposição a episódios trombóticos, chamados de estados de hipercoagulabilidade, que podem ser primários ou secundários. A **Figura 13.25** ilustra os estados de hipercoagulabilidade.



**FIGURA 13.25** Estados de hipercoagulabilidade.

O estado de hipercoagulabilidade primário caracteriza-se por ser de herança genética, e o secundário, adquirido.<sup>1</sup> O estado de hipercoagulabilidade primário apresenta deficiência nos inibidores fisiológicos da coagulação, que é caracterizada por mutações nos genes que codificam esses fatores ou por alteração no sistema fibrinolítico.<sup>1</sup> O estado de hipercoagulabilidade secundário é classificado em alto e baixo risco. São situações ou doenças que predisõem a episódios de trombose. O **Quadro 13.2** mostra as situações ou doenças que podem predispor a um estado de hipercoagulabilidade secundário.

Os inibidores fisiológicos da coagulação são os seguintes: o complexo da proteína S (PS) e da proteína C (PC), a trombomodulina (TM), a antitrombina (AT), o receptor endotelial da proteína C (REPC) e o inibidor da via do fator tissular (IVFT). Mutações nos inibidores fisiológicos da coagulação são herdados e predisõem o portador a um risco aumentado de trombose com relação à população em geral, caracterizando um estado de hipercoagulabilidade primário conhecido como trombofilia.<sup>1</sup> Deficiências da PS, PC, AT, mutações no gene da protrombina (que causam o aumento da concentração da protrombina), hiperhomocisteinemia, disfibrinogenemias e o fator V



QUADRO 13.2 Situações ou doenças que predispoem a um estado de hipercoagulabilidade secundário
<b>Alto risco</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Imobilização prolongada</li><li>▪ Infarto do miocárdio</li><li>▪ Miocardiopatia</li><li>▪ Fraturas, queimaduras</li><li>▪ Cirurgias</li><li>▪ Falência cardíaca</li><li>▪ Valvas cardíacas</li><li>▪ Coagulação intravascular disseminada</li><li>▪ Púrpura trombocitopênica trombótica</li></ul>
<b>Baixo risco</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Fibrilação arterial</li><li>▪ Miocardiopatia</li><li>▪ Síndrome nefrótica</li><li>▪ Gestação tardia</li><li>▪ Anticoncepcionais orais</li><li>▪ Hiperlipidemia</li><li>▪ Anticoagulante lúpico</li><li>▪ Anemia falciforme</li><li>▪ Tabagismo</li><li>▪ Trombocitose</li></ul>

Fonte: Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

de Leiden (fator V resistente à ação da PS e PC) são as causas de trombofilias.

⚡ TROMBOFILIAS

Proteína C

A proteína C (PC) foi descrita por Stenflo (1976) a partir de estudos de fatores dependentes de vitamina K em plasma bovino.<sup>1</sup> A deficiência da PC foi descrita pela primeira vez em 1981.<sup>48</sup> A PC é uma glicoproteína de síntese hepática, dependente de vitamina K, sintetizada a partir do gene localizado no cromossomo 2q14-21, com 9 éxons e 8 íntrons e uma vida média de cerca de 8 a 10 horas.<sup>1</sup> A PC adquire atividade de serinoprotease por ação da trombina em presença da trombomodulina, um receptor da trombina que se expressa na membrana citoplasmática das células endoteliais. A PC é ativada quando ocorre formação de trombina e exposição de trombomodulina na superfície das células endoteliais, que recobrem a luz dos vasos sanguíneos; é ativada, portanto, pelo complexo trombina-trombomodulina. A ativação da PC compreende uma clivagem entre os aminoácidos arginina-167 e isoleucina-170, pela trombina, e é dependente de cálcio; a trombomodulina acelera a ação da trombina sobre a PC.<sup>1</sup> A PC ativada forma

um complexo com a PS, a qual é seu cofator; o complexo PC-PS inativa os fatores V e VIII ativados.<sup>1</sup> A inativação dos fatores V e VIII ativados ocorre porque o complexo PC-PS exerce uma ação proteolítica (clivagem) no fator V ativado, entre o aminoácido arginina-506 e arginina-306.<sup>1</sup> A ação proteolítica no fator VIII ativado ocorre com a clivagem entre os aminoácidos arginina-562 e 362.<sup>1</sup> Os inibidores do complexo PC-PS são o inibidor da PC, também conhecido como inibidor do ativador do plasminogênio, a  $\alpha$ -1-antitripsina e a  $\alpha$ -2-macroglobulina.

Mais de cem mutações já foram descritas no gene da PC, sendo todas associadas com episódios de trombose e classificadas em mutações do tipo I e do tipo II. As mutações do tipo I caracterizam-se por apresentarem deficiência tanto na atividade como na antigenicidade;<sup>1,2</sup> as do tipo II apresentam deficiência na atividade com antigenicidade normal.<sup>1,2</sup>

Os heterozigotos para a PC apresentam herança autossômica dominante, e as formas mais graves apresentam herança autossômica recessiva.<sup>2</sup> A incidência da deficiência da proteína C, no estado heterozigoto, ocorre em 0,2 a 0,4% das pessoas.<sup>49,50</sup> Em 70% dos pacientes, o episódio inicial de trombose ocorre espontaneamente, e em 30%, está associado com algum fator de risco, como gestação, parto, uso de anticoncepcionais orais, cirurgias ou traumas.<sup>2</sup> Geralmente, os episódios trombóticos se manifestam após os 50 anos.<sup>2</sup> O risco de um afetado fazer um quadro de trombose é de 3 a 7 vezes maior que a população normal.<sup>1</sup>

Existe uma síndrome chamada de necrose cutânea induzida pela varfarina, que ocorre em pessoas com deficiência de proteína C que iniciam o tratamento com a varfarina.<sup>2,51</sup> Quando a varfarina é administrada, ocorre a inibição da PC e do fator VII, ambos são dependentes de vitamina K. A diminuição da atividade anticoagulante da PC cai para mais de 50% no primeiro dia da administração da varfarina,<sup>2</sup> enquanto a inibição do fator VII se dá de um modo bastante lento.<sup>2</sup> Se o paciente está tomando anticoagulante oral com a finalidade de inibir a formação de trombos, a redução drástica da PC (em pacientes deficientes dela) leva o paciente a um estado de hipercoagulabilidade transitório.<sup>2</sup> As lesões da pele ocorrem nas extremidades, nos seios, no tronco e no pênis,<sup>2</sup> e a biópsia dessas lesões demonstra a presença de trombos de fibrina nos vasos cutâneos e hemorragia.<sup>2</sup>



Os homozigotos para a deficiência da PC podem apresentar uma doença chamada de púrpura neonatal fulminante,<sup>1</sup> que, laboratorialmente, evidencia um quadro de coagulação intravascular disseminada associada a um nível antigênico menor que 1% do normal.<sup>2</sup>

A PC pode ser dosada por método cromogênico, coagulométrico e por ELISA. A melhor maneira de diagnosticar a deficiência da PC é pelo método coagulométrico.<sup>52</sup> Esse método usa o TTPa adicionado de plasma deficiente de PC e um ativador da PC (veneno da *agkistrodon contortrix contortrix*). Quando se mistura o plasma do paciente com o plasma deficiente em PC, a inibição da formação do coágulo é exclusiva da concentração de PC do plasma do paciente. Se a concentração de PC é normal, a formação do coágulo é longa (acima de 100 segundos),<sup>53</sup> porque a PC está inibindo a ação anticoagulante dos fatores V e VIII. Se o plasma do paciente é deficiente de PC, o tempo de formação do coágulo é curto (próximo a 30 segundos), porque não há inibição dos fatores V e VIII.<sup>53</sup>

Como a proteína C é dependente da vitamina K, a dosagem não pode ser feita na vigência de anticoagulante oral. Caso o paciente esteja em terapia anticoagulante (anticoagulante oral), é recomendado que o exame seja feito após 30 dias da suspensão do anticoagulante.<sup>54</sup> Outros autores descrevem que a dosagem da PC pode ser feita após duas semanas da suspensão do anticoagulante oral.<sup>12</sup> A deficiência da proteína C não altera o TP e o TTPa.

Pacientes com doença hepática, processos infecciosos, coagulação intravascular disseminada ou fazendo uso de metotrexate ou ciclofosfamida podem apresentar deficiência adquirida da PC.

### Proteína S

A proteína S foi purificada no plasma por DiScioppio, que a chamou de proteína S em homenagem à cidade de Seattle.<sup>1</sup> A PS é dependente de vitamina K e é sintetizada no fígado, no rim, nos testículos, nos megacariócitos e nas células endoteliais.<sup>1</sup> O gene que codifica a PS está localizado no cromossomo 3 p11.1-11.2, contém 15 éxons e 14 íntrons.<sup>1</sup> A PS é um cofator para a PC, potencializando a inativação dos fatores V e VIII ao aumentar a afinidade da PC por esses fatores; a regulação da inativação da PS dá-se por meio do complemento (C4) e da trombina.<sup>1</sup> Em média, nos pacientes

deficientes de PS, o primeiro episódio trombótico ocorre aos 28 anos, com uma variação entre 15 e 68 anos, e 56% dos episódios ocorrem de modo espontâneo.<sup>2</sup>

Cerca de 60% da proteína S circula no plasma complexado ao sistema complemento (C4-binding protein), 40% circulam de modo livre;<sup>2,11</sup> a última tem atividade de cofator da proteína C.<sup>1</sup> Mais de cem mutações já foram descritas na molécula da PS e estão associadas à trombose.<sup>1</sup> A deficiência da PS é classificada em três tipos: I, II e III.<sup>2</sup> No tipo I, a deficiência está associada à redução de 50% no nível antigênico da proteína S total, à redução no nível antigênico da proteína S livre e à diminuição da atividade funcional em torno de 40%.<sup>2</sup> Na deficiência do tipo II, a atividade funcional está diminuída, mas o nível antigênico tanto da PS complexada como da livre são normais.<sup>2</sup> A deficiência do tipo III está associada à diminuição da atividade funcional e do nível antigênico da PS livre, com nível antigênico da complexada normal.<sup>2</sup> Os heterozigotos para a deficiência da PS têm uma herança autossômica dominante, e as formas mais graves de deficiência são autossômicas recessivas.<sup>2</sup>

Deficiências adquiridas da PS estão descritas durante a gestação e na vigência de anticoncepcionais orais.<sup>1</sup>

Como a proteína S é dependente de vitamina K, as mesmas recomendações feitas para a proteína C em relação a suspensão do anticoagulante oral devem ser seguidas.

### Antitrombina

A antitrombina (AT) é uma glicoproteína sintetizada no tecido hepático e pelas células endoteliais, cujo gene está localizado no cromossomo 1 (1q23-25).<sup>1</sup> Tem como função fisiológica a inibição do fator X ativado, da trombina e dos fatores XIIa, XIa e IXa.<sup>1</sup> Tem a sua ação potencializada pela ação da heparina, muitas vezes sendo referida como um cofator da heparina.<sup>1</sup>

A primeira descrição familiar da deficiência de AT foi feita em 1965 e predispõe os pacientes a um risco duas vezes maior que a população em geral a desenvolverem episódios de trombose.<sup>1</sup> A deficiência de AT é uma herança autossômica dominante, sendo classificada em mutações do tipo I e tipo II.<sup>1,2</sup> A primeira refere-se a uma diminuição quantitativa (antigênica), e a segunda a uma diminuição da atividade funcional da molécula, mas com nível antigênico normal. Cerca de



40% das mutações é do tipo II, e 40% dos pacientes com deficiência de AT apresentam episódios espontâneos de trombose.<sup>1,2</sup> Em 60% dos casos, o episódio de trombose está relacionado com gestação, parto, anticoncepcionais orais, cirurgias e traumatismos.<sup>1,2</sup> Os episódios trombóticos de recorrência ocorrem em 60% dos afetados e 40% deles apresentam sinais clínicos de embolismo pulmonar.<sup>2</sup>

Está descrita a deficiência adquirida de AT, a qual ocorre na coagulação intravascular disseminada, doença hepática, síndrome nefrótica e pré-eclâmpsia e em pacientes em uso de anticoncepcional oral.<sup>1</sup>

A atividade funcional da AT pode ser avaliada por métodos coagulométricos<sup>55</sup> ou cromogênicos,<sup>53</sup> e o nível antigênico pode ser medido por ELISA,<sup>53</sup> imunoeletroforese<sup>53</sup> e nefelometria.<sup>53</sup> Na deficiência da antitrombina, o TP e o TTPa são normais.

### Trombomodulina

O gene que sintetiza a trombomodulina (TM) está localizado no cromossomo 20.<sup>1</sup> A TM é uma proteína transmembrana que se expressa na superfície das células endoteliais e tem a função de cofator para a ação da trombina na ativação da proteína C. A trombina somente ativa a PC se estiver ligada à TM, portanto essa última faz com que a trombina passe a ter uma função anticoagulante.<sup>1</sup> Quando ligada à TM, a trombina não exerce ação sobre o fibrinogênio e nem ativa fatores da coagulação.<sup>1</sup>

Deficiências hereditárias da TM estão associadas ao risco aumentado para trombose e foram descritas mutações no gene da TM em famílias com trombose.<sup>1</sup> A expressão da TM é modulada por endotoxinas e citocinas inflamatórias; neutrófilos ativados inibem a expressão da TM.<sup>1</sup>

### Receptor endotelial da proteína C

O receptor endotelial da PC (EPCR, do inglês *endothelial protein c receptor*) é uma glicoproteína cujo gene está localizado no cromossomo 20 (20q11.2).<sup>1</sup> O EPCR está localizado predominantemente em vasos de grande calibre, enquanto a TM predomina na microcirculação.<sup>1</sup> A ação do EPCR é a de aumentar significativamente a ativação da PC pelo complexo trombina-trombomodulina.

### Inibidor da via do fator tissular

É sintetizado pelas células endoteliais, o seu gene está localizado no cromossomo 2 e é uma

glicoproteína com 276 aminoácidos.<sup>1</sup> É encontrado em associação com as plaquetas e com lipoproteínas plasmáticas, mas sua maior concentração está na superfície das células endoteliais.<sup>1</sup> Sua função fisiológica é a inibição do complexo fator VII-TF e do fator X ativado: somente inibe o complexo VII-TF quando ligado ao Xa.<sup>1</sup> O TFPI tem sua concentração aumentada em 2 a 10 vezes na circulação, após a administração de heparina.<sup>1</sup>

### Mutações no gene da protrombina

Descrita em 1996, por Poort e colaboradores,<sup>56</sup> é chamada de mutação 20.210G/A pelo fato de a mutação pontual ocorrer na posição 20.210 no gene da protrombina, trocando guanina por adenina.<sup>1</sup> Essa mutação leva ao aumento na concentração de protrombina.<sup>1</sup> A prevalência de portadores na população em geral é de cerca de 1 a 4%, mas há variação conforme a distribuição geográfica.<sup>1</sup> Essa mutação predispõe o portador a um risco aumentado de trombose 2,8 vezes maior que a população em geral<sup>2</sup> e pode ser identificada por biologia molecular utilizando a técnica de PCR.<sup>2,56</sup> A concentração da protrombina não pode ser utilizada como um teste de *screening* porque a concentração da molécula da protrombina varia muito na população normal.<sup>2,56,57</sup>

### Hiper-homocisteinemia

A vitamina B<sub>12</sub>, após ser absorvida, é transportada e reduzida a metilcobalamina, a qual é um cofator essencial para a enzima 5-metiltetra-hidrofolato-homocisteína metiltransferase. Essa enzima converte o ácido N-5-metiltetra-hidrofólico (principal forma do ácido fólico no plasma) para tetra-hidrofolato, que é requerido para a conversão da deoxiuridina monofosfato para deoxitimidina monofosfato, a qual é um precursor da timina na síntese do DNA.<sup>1</sup> A síntese do tetra-hidrofolato requer a participação do aminoácido metionina que, nesse processo, gera a homocisteína, a qual, na presença da enzima cistationina-β-sintetase (CBS) e da metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR), forma a cisteína.<sup>1</sup> A deficiência de CBS e MTHFR caracteriza um aumento plasmático da homocisteína (hiper-homocisteinemia).<sup>1</sup> McCully, em 1969, foi o primeiro a associar a hiper-homocisteinemia com aterosclerose; em 1976, Wilcken e colaboradores correlacionaram níveis moderados de homocisteína com doença arterial coronariana.<sup>1</sup> A homocisteinemia grave está associada à aterosclerose prematura e trombose arterial;<sup>2</sup> a



hiper-homocisteinemia leve ou moderada é um fator de risco para aterosclerose e trombose.<sup>2</sup>

O mecanismo pelo qual a hiper-homocisteinemia atua como aterogênica ou como um fator de risco trombogênico não está totalmente elucidado, mas *in vitro* ela induz a célula endotelial a expressar fator tissular. Isso desencadeia a cascata da coagulação,<sup>2</sup> inibindo a expressão de heparan sulfato,<sup>2</sup> a liberação de óxido nítrico e prostaciclina,<sup>2</sup> os ativadores teciduais do plasminogênio<sup>2</sup> e a expressão da trombomodulina.<sup>2</sup>

Nutrição, idade, diabetes, hipotireoidismo, doenças renais, além das deficiências genéticas de CBS e MTHFR contribuem para a hiper-homocisteinemia e predisõem o paciente a um risco maior de trombose arterial e venosa.<sup>1</sup> A incidência de trombose na deficiência genética é de 1 a cada 250.000 pessoas na forma homozigota e 1 a cada 70 pessoas na heterozigota.<sup>1</sup>

A homocisteína pode ser dosada por ELISA.<sup>53</sup>

### Concentração elevada de fibrinogênio

O aumento da concentração de fibrinogênio pode ser observado em diversos processos inflamatórios (proteína de fase aguda) e durante a gestação e é um fator de risco para episódios trombóticos e aterosclerose. Fatores como álcool, estresse e tabagismo aumentam a concentração de fibrinogênio.

### Fator V de Leiden

A mutação que leva à resistência do fator V à ação do complexo PC-PS (fator V de Leiden) também é chamada de FV Q<sup>506</sup>. Essa mutação foi descrita por Dahlbläck e colaboradores<sup>58</sup> e recebeu o nome de fator V de Leiden em homenagem à cidade holandesa onde foi descoberta.<sup>1</sup> A prevalência dessa mutação chega a 4% da população; entre os pacientes com trombose venosa, a prevalência pode chegar a 20%.<sup>1</sup>

O fator V é uma glicoproteína cujo gene está localizado no cromossomo 1 e possui 25 éxons e 24 íntrons. Cerca de 20% do fator V plasmático são produzidos pelos grânulos alfa das plaquetas. Seu ativador primário é a trombina, podendo ser ativado pelo fator X ativado. A ativação do fator V significa clivagens nos resíduos de aminoácidos na posição 709, 1018 e 1545.

A proteína C é uma protease-chave na regulação da coagulação e está presente na circulação como precursora inativa, sendo ativada rapidamente quando entra em contato com a trombina ligada ao receptor da trombomodulina nas células

endoteliais. O complexo PC-PS inativa dois cofatores da cascata da coagulação, o fator VIII e o fator V. O complexo PC-PS cliva a molécula do fator V nos resíduos de posição 306 e 506. Mutações na molécula do fator V, especificamente no aminoácido arginina (posição 506), conferem a resistência ao complexo PC-PS, que é a mutação conhecida como fator V de Leiden e que predispõe a um estado de hipercoagulabilidade.<sup>1</sup>

Em estado heterozigoto, aumenta cerca de oito vezes a probabilidade de trombose e, como homozigoto, o risco fica aproximadamente cem vezes na população em geral.<sup>1</sup> A resistência à proteína C ativada (RPCA) é um fator predisponente ao tromboembolismo venoso e, excepcionalmente, ao arterial.<sup>1</sup> A causa mais comum para trombose venosa hereditária é a presença de fator V resistente à ação proteolítica da proteína C ativada. A resistência à proteína C ativada é encontrada em 15 a 30% dos pacientes com trombose venosa profunda e em cerca de 50% dos pacientes com trombofilia familiar.<sup>1</sup> A maioria dos indivíduos (cerca de 95%) que apresenta RPCA é portadora da mutação Q<sup>506</sup> do gene do fator V.<sup>1</sup> Muitos indivíduos que apresentam a mutação do fator V de Leiden não mostram sinais de trombose, exceto quando expostos a fatores adicionais, como o uso de anticoncepcional oral, gravidez ou cirurgia.<sup>1</sup>

A resistência à proteína C ativada pode ser medida por método coagulométrico (usando como base o TTPa),<sup>53</sup> que, quando realizado em condições técnicas apropriadas, pode classificar corretamente quase 100% dos pacientes.<sup>1</sup> É um teste específico e sensível quando comparado com a biologia molecular.<sup>59</sup> As mutações do fator V de Leiden também podem ser avaliadas por biologia molecular, pela técnica de PCR.<sup>53</sup>

### Nível elevado de fator VIII

Níveis elevados de fator VIII geralmente são observados em associação com aumento da idade e da massa corporal, gestação, cirurgia, inflamação crônica, doença hepática, hipertireoidismo, diabetes melito e exercícios.<sup>60</sup> O grupo sanguíneo ABO exerce um efeito sobre a concentração do fator VIII e do fator de von Willebrand. Pessoas que não são do grupo sanguíneo "O" têm concentrações significativamente maiores desses fatores que os indivíduos do grupo "O".<sup>61</sup> Os sintomas clínicos são semelhantes aos pacientes com trombofilia por outras causas.<sup>12</sup> Há uma correlação entre o risco de tromboembolismo venoso e o aumento da



concentração do fator VIII. Indivíduos com concentração de fator VIII entre 100 a 125% do normal têm uma possibilidade 2,3 vezes maior que a população em geral de ter um episódio trombótico.<sup>62</sup> Indivíduos com uma concentração de fator VIII de 150% ou mais do normal têm uma possibilidade 4,8 vezes maior que a população em geral de ter um episódio trombótico.<sup>62</sup>

A atividade do fator VIII pode ser medida pela dosagem do fator VIII, utilizando um plasma depletado de fator VIII e um plasma de referência normal.<sup>12</sup> A dosagem de atividade do fator VIII não deve ser feita logo após o episódio trombótico e nem na vigência de reações de fase aguda; é sugerido que a dosagem da atividade do fator VIII seja feita em dois momentos.<sup>12</sup>

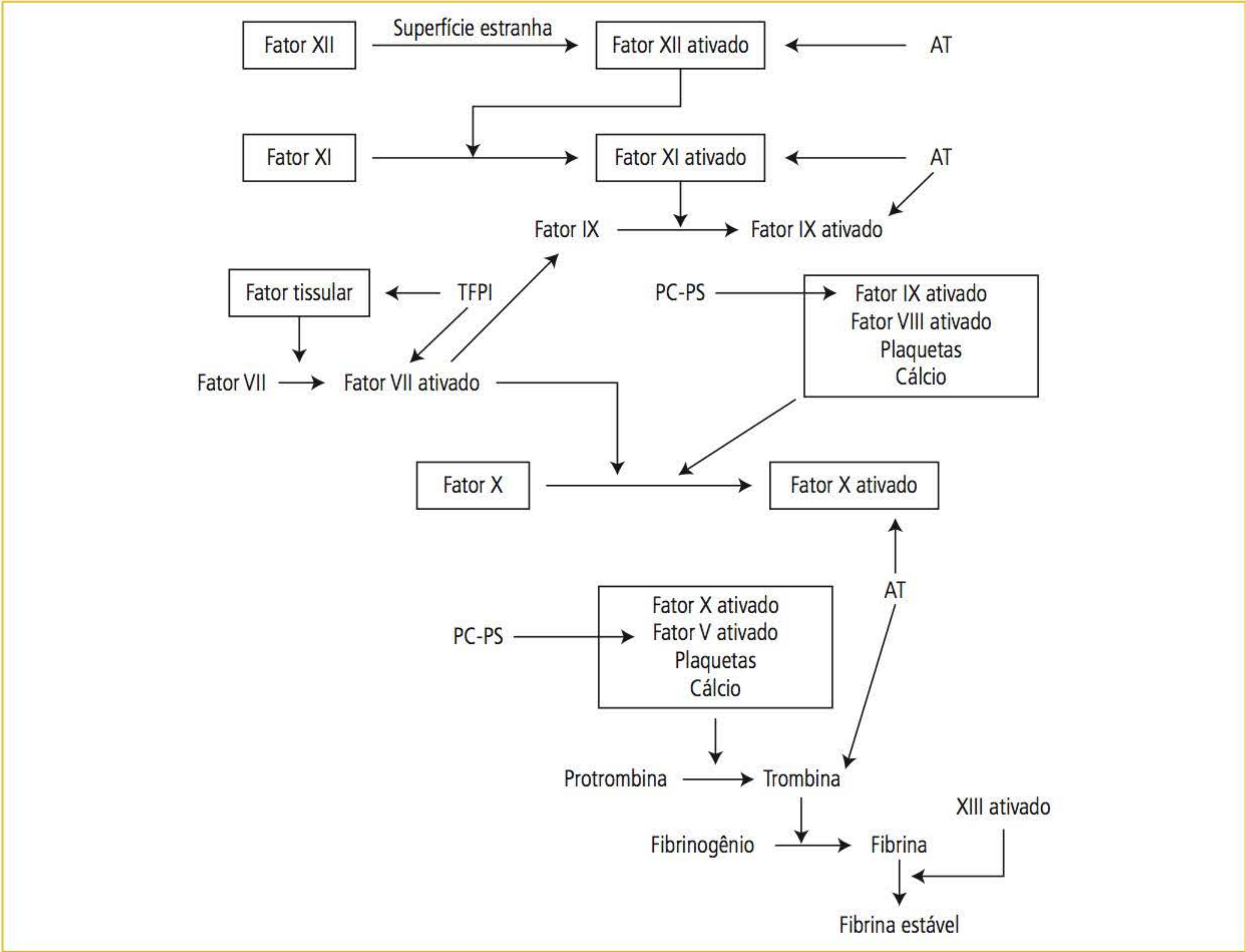
**Ação dos inibidores fisiológicos da coagulação sobre a cascata da coagulação**

A TM se expressa na superfície das células endoteliais quando a trombina é gerada, e as duas formam um complexo que ativa a PC, que, unida à

PS, inativa tanto o fator Va como o VIIIa. O receptor endotelial para a PC aumenta significativamente a afinidade do complexo TM-trombina pela PC. A AT inativa os fatores IXa, Xa, XIa, XIIa e a trombina. O TFPI inibe o complexo fator VII-TF e o Xa. Desse modo, o organismo faz com que a geração de um trombo (atividade pró-coagulante) fique restrita ao local da lesão e perdure até que a lesão vascular esteja recomposta. Quando esses fatores estão deficientes, trombos podem ser gerados, com um consequente quadro de trombose arterial ou venosa. A **Figura 13.26** mostra a ação dos inibidores fisiológicos sobre a cascata da coagulação.

**TROMBOSE**

A formação patológica de trombo recebe a denominação de trombose. A integridade dos vasos sanguíneos, relacionada com o tônus vascular, a estrutura das células endoteliais, a velocidade e as alterações do fluxo sanguíneo, as plaquetas, os fa-



**FIGURA 13.26** Ação dos inibidores fisiológicos da coagulação sobre a cascata da coagulação.

Fonte: Adaptada de Siva e Hashimoto.<sup>55</sup>

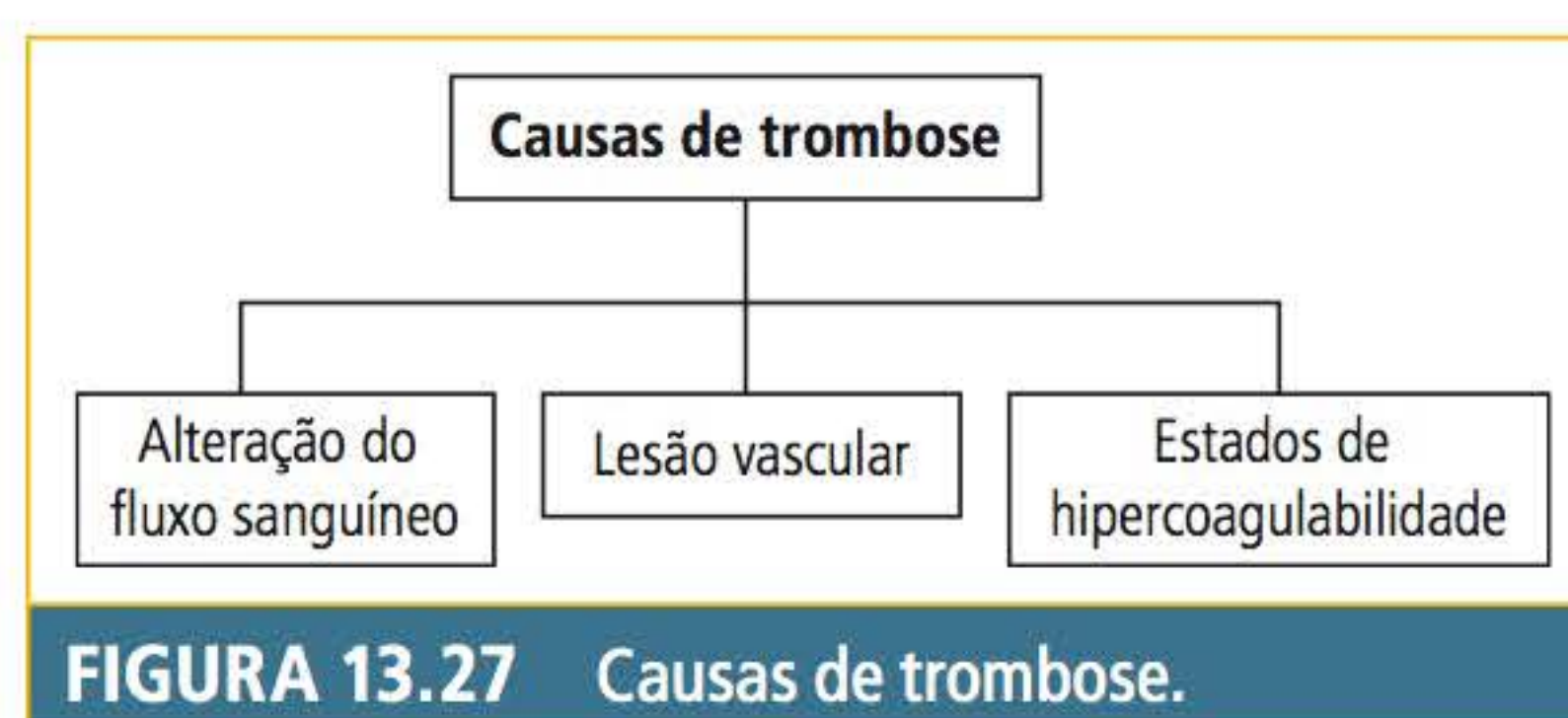


tores da coagulação, os inibidores fisiológicos da coagulação e o sistema fibrinolítico são primordiais para uma hemostasia normal. Quando qualquer um, ou a combinação de mais de um, altera-se, a predisposição para episódios trombóticos aumenta. A trombose pode ocorrer tanto em artérias quanto em veias, sendo denominada de trombose arterial ou venosa. Tem como fator complicador a embolia, considerada uma das mais importantes causas de morte atualmente. A trombocitose e a ativação plaquetária, o aumento da concentração dos fatores da coagulação (especificamente fatores VII, VIII, IX, XI e fibrinogênio), o fator V de Leiden, a deficiência dos inibidores fisiológicos da coagulação e as alterações do sistema fibrinolítico estão associados com risco aumentado de trombose.<sup>1</sup> De modo geral, pode-se dizer que a trombose ocorre por alteração do fluxo sanguíneo, por lesão vascular e pelos estados de hipercoagulabilidade.

Os trombos podem-se desenvolver em qualquer local do sistema cardiovascular, no interior das câmaras cardíacas, nas cúspides valvares, em artérias, veias ou capilares. São de tamanho e forma variáveis, de acordo com o local de origem e as circunstâncias que levaram ao seu desenvolvimento. Os trombos arteriais ou cardíacos geralmente começam em um local de lesão endotelial ou turbulência. Já os trombos venosos ocorrem, normalmente, em áreas de estase.

A trombose venosa quase sempre é oclusiva; muitas vezes, o trombo cria um molde ao longo da luz do vaso, sendo mais comum em veias profundas dos membros inferiores (90% dos casos), embora também possa ocorrer em veias superficiais.<sup>1</sup> Os trombos superficiais ocorrem no sistema safena, podem causar congestão local, tumefação, dor e hipersensibilidade ao longo do trajeto do vaso envolvido e raramente embolizam.<sup>1</sup> A trombose venosa profunda (TVP) está associada aos estados de hipercoagulabilidade. Uma das principais consequências da TVP é o tromboembolismo.<sup>1</sup> A doença tromboembólica venosa (TEV) é causa importante de morbidade e mortalidade. É um problema grave associado a mais de 250 mil internações hospitalares por ano e aproximadamente 50 mil óbitos.<sup>1</sup> A **Figura 13.27** ilustra as causas de trombose.

As alterações do fluxo sanguíneo podem ser causadas tanto por trombose arterial quanto por venosa. A primeira caracteriza-se por aumento do



**FIGURA 13.27** Causas de trombose.

Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

fluxo em termos de velocidade, e a segunda, pela estase sanguínea. A trombose arterial (por aumento da velocidade do fluxo sanguíneo) caracteriza-se por ativar a célula endotelial da luz do vaso com expressão do fator de von Willebrand, o qual adere às plaquetas ao endotélio. As plaquetas ativadas promovem a agregação de novas plaquetas, aumentando progressivamente o tamanho do trombo, que é rico em plaquetas, tem pouca fibrina, poucos eritrócitos e leucócitos e recebe a denominação de trombo branco.<sup>1</sup> Esse tipo de trombose arterial pode ocorrer por hipertensão, turbulências no fluxo sanguíneo em pontos de placas de aterosclerose e em situações de hiperviscosidade (leucemia mieloide crônica, policitemia vera, mieloma múltiplo e macroglobulinemia de Waldeström).<sup>1</sup> A principal consequência da evolução do trombo é a obstrução parcial ou completa da luz do vaso (vasoclusão), com consequente isquemia, infarto tecidual e embolia. Situações de estase sanguínea, como compressão vascular extrínseca causada por tumor, pacientes acamados por tempo longo (p. ex., pós-operatório), aumento de fatores pró-coagulantes e perda de tônus vascular, levam à ativação dos fatores da coagulação e à trombose venosa. Esse trombo é denominado de trombo vermelho por ser rico em fibrina com a retenção de grande quantidade de eritrócitos. A formação do trombo vermelho leva à vasoclusão, e a consequência mais séria é a embolia.

A lesão vascular pode levar tanto à trombose arterial quanto à venosa. Rompimento de placa de aterosclerose, hiper-homocisteinemia e formação de aneurismas são situações que expõem o subendotélio e o fator de von Willebrand com consequente adesão e agregação plaquetárias. A estabilização do trombo plaquetário dá-se pela formação de fibrina, tanto pela ativação da fase contato quanto pela exposição de fosfolípidos, ativando o fator VII e, consequentemente, a cascata da coagulação. A situação descrita ocasiona a trombose arterial. A trombose venosa, na lesão vascular,



apresenta um vaso sanguíneo histologicamente normal, e fatores extrínsecos ao vaso, como a redução do tônus venoso durante a gestação e o uso de anticoncepcionais orais, é que predispõem à trombose venosa por ativação dos fatores da coagulação, principalmente pela liberação de fator tecidual.

A trombose venosa profunda (TVP) está associada com os estados de hipercoagulabilidade, e uma das principais consequências da TVP é o tromboembolismo.

EMBOLIA PULMONAR

A embolia pulmonar (EP) caracteriza-se por trombos que bloqueiam os vasos pulmonares. Com maior frequência, é causada por trombos venosos originados de trombose de membros inferiores e da pélvis.<sup>1</sup> O tromboembolismo pulmonar (TEP) ocorre em cerca de 50% dos pacientes com trombose venosa profunda (TVP) e geralmente é assintomático.<sup>1</sup> Os sintomas do TEP são tosse de início súbito, podendo originar secreção sangüinolenta, dor torácica, aumento da frequência respiratória e taquicardia.

Um coágulo (ou parte dele) formado em uma veia de um membro inferior pode se desprender de seu local de origem e ganhar o fluxo sanguíneo. Ele sairá da veia original e subirá progressivamente até atingir a veia cava inferior. Seguirá, então, por dentro do coração, pelo átrio direito e ventrículo direito. Daí passará ao tronco da artéria pulmonar direita ou esquerda e a seus ramos progressivamente menos calibrosos. Quando atingir um ramo mais estreito que seu tamanho, o coágulo irá parar e interromper a circulação

local, o que caracteriza o quadro clínico de embolia pulmonar. Os êmbolos podem ser coágulos sanguíneos, bolhas de gás ou gordura, entre outras possibilidades. O termo embolia pulmonar é usado quase como sinônimo de embolia por coágulo, já que é a situação mais comum. A **Figura 13.28** mostra o caminho que o coágulo faz, pelo interior do coração, até atingir a artéria pulmonar.

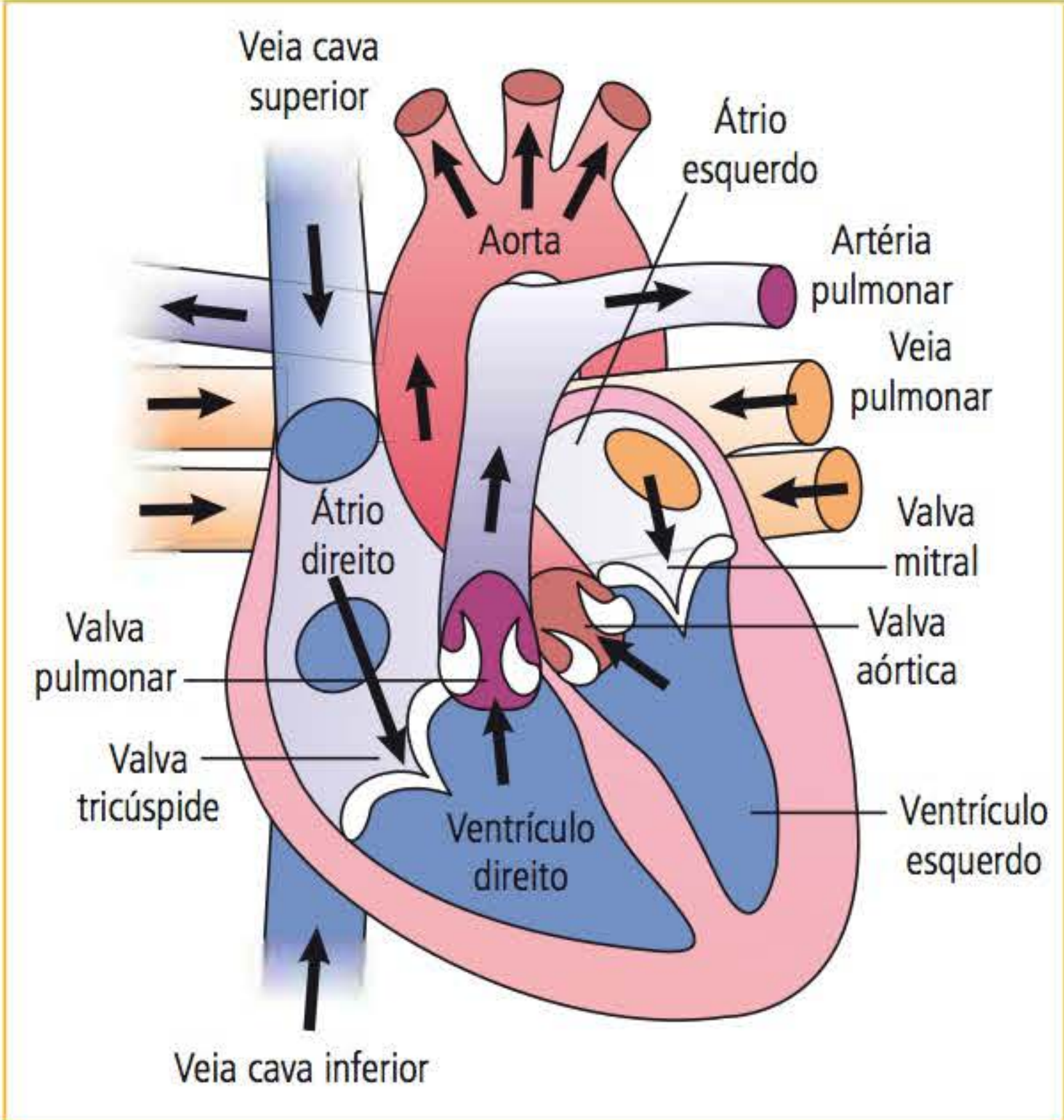


FIGURA 13.28 Caminho que o coágulo faz, pelo interior do coração, até atingir a artéria pulmonar.

A dosagem do D-dímero é útil para excluir o diagnóstico de TVP e TEP, e um resultado negativo exclui o diagnóstico.<sup>63,64</sup> Um resultado positivo de D-dímero não ajuda no diagnóstico porque ele não é específico para TEP e TVP.<sup>3</sup> A **Figura 13.29**

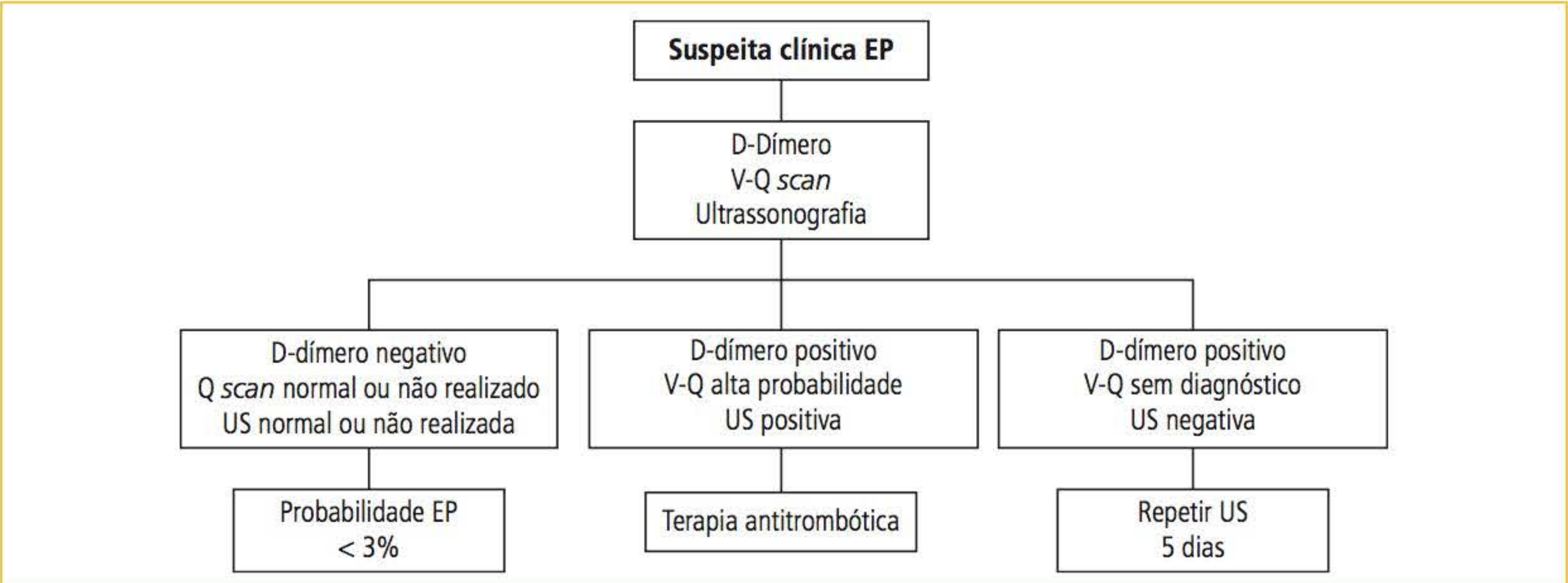


FIGURA 13.29 Esquema para monitorar a suspeita de embolia pulmonar. Scanning pulmonar por ventilação (V); perfusão (Q); ultrassonografia (US).



traz um esquema para monitorar a suspeita de embolia pulmonar.

Com o uso de anticorpos monoclonais, o D-  
dímero pode ser dosado diretamente no sangue  
total,<sup>1</sup> pode ser medido por aglutinação de látex<sup>53</sup>  
e por ELISA.<sup>53</sup>

## CONTROLE DA TERAPIA ANTITROMBÓTICA

A anticoagulação pode ser obtida de três maneiras: com as heparinas de alto peso molecular (HAPM), ou heparinas não fracionadas, as heparinas de baixo peso molecular (HBPM), pelo uso de anticoagulantes orais, e os agentes fibrinolíticos. Os agentes antiagregantes foram discutidos no tópico referente à curva de agregação plaquetária.

A HAPM é composta de glicosaminoglicans com peso molecular que varia entre 5.000 a 30.000 dáltons.<sup>1</sup> Tem uma ação sobre a antitrombina, potencializando sua ação sobre a trombina.<sup>1</sup> O monitoramento da HAPM deve ser feito preferencialmente pelo TTPa.<sup>2</sup> Contudo, pacientes com lúpus eritematoso sistêmico ou SAF geralmente demonstram TTPa elevados devido à alta concentração de fosfolípidos e devem ser monitorados por meio de ensaios com heparina, como o fator anti-Xa. Na terapia com heparina não fracionada, ou HAPM, os valores de referência para o fator anti-Xa variam de 0,3 a 0,7 UI/mL. A dose terapêutica da HAPM deve ser baseada em nomogramas que levam em consideração o peso do paciente, e a dose é dada em quantidade de heparina (unidades)/peso/hora.<sup>1</sup> Seis horas após a infusão inicial, deve ser feito um TTPa; se o resultado do TTPa for de 1,5 a 2,3 vezes o valor do controle normal, a anticoagulação está atingida.<sup>65,66</sup> O TTPa basal (TTPa antes do início da infusão) deve ser realizado porque o valor do TTPa (população normal) varia bastante em função principalmente da concentração do fator VIII.

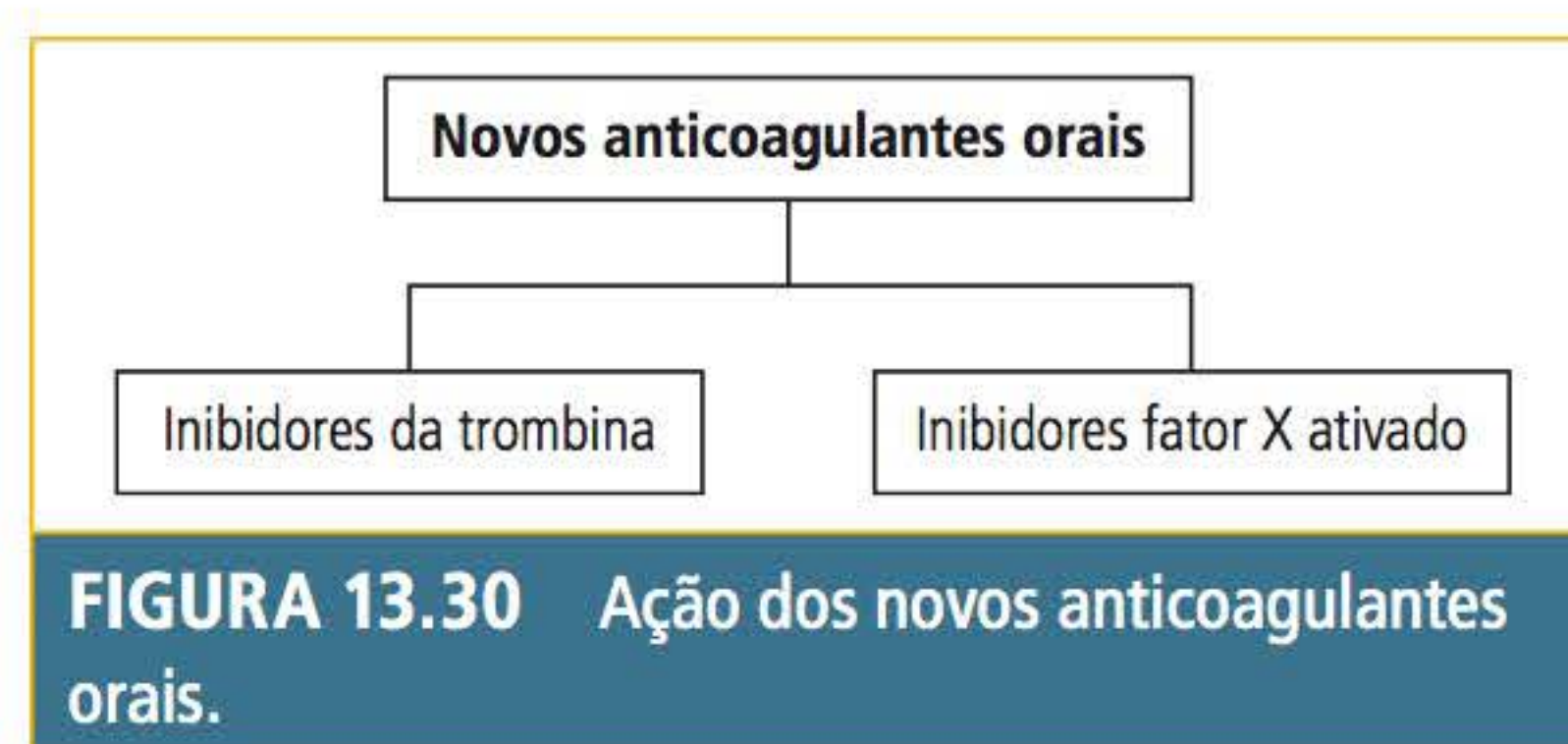
Atualmente, as HBPMs são preferidas com relação às HAPMs porque apresentam maior eficácia na prevenção do tromboembolismo venoso e menor frequência de complicações hemorrágicas, dispensam o controle laboratorial constante (o TP e o TTPa não podem ser utilizados para o controle das HBPMs), o risco de trombocitopenia induzida pela heparina é menor, e a meia-vida plasmática é maior.<sup>3</sup> Devido ao baixo peso molecular, as HBPMs não conseguem complexar-se com a antitrombina; a anticoagulação é conseguida pela ini-

bição do fator Xa. Assim, o teste de escolha para o monitoramento laboratorial deve ser a dosagem do fator anti-Xa, o qual possui valores de referência para a terapia com HBPM que variam de 0,5 a 1,0 UI/mL.

A dosagem do fator anti-Xa tem por objetivo auxiliar no monitoramento da terapêutica com heparina de baixo peso molecular e heparina não fracionada, especialmente em pacientes com trombose e que possuam características que interferem na farmacocinética da heparina, como insuficiência renal, obesidade, magreza acentuada, neoplasias, mulheres no terceiro trimestre de gestação, assim como pacientes pediátricos, idosos, tratados e que possuam manifestações hemorrágicas, com LES ou com SAF.

Na heparinoterapia, tanto com as HAPMs quanto com as HBPMs, é recomendado que seja feita a contagem de plaquetas antes do início do tratamento e durante o tratamento, para monitorar o número de plaquetas e prevenir a trombocitopenia induzida pela heparina (TIH),<sup>1</sup> descrita no tópico sobre púrpuras trombocitopênicas adquiridas.

Os anticoagulantes orais devem ser monitorados pelo TP conforme está descrito no tópico Tempo de protrombina, válido para as varfarinas. Os novos anticoagulantes orais dispensam o controle laboratorial. A **Figura 13.30** mostra a ação desses novos anticoagulantes orais.



O dabigatran é um anticoagulante oral inibidor da trombina. Seu pico de ação ocorre entre 1 a 2 horas após a administração via oral;<sup>12</sup> tem uma meia-vida de aproximadamente 12 horas. Não requer cofator e inibe, de modo reversível, o sítio ativo da trombina.<sup>67</sup> Não interfere com os medicamentos que são metabolizados pelo sistema enzimático do citocromo P450 e produz uma resposta anticoagulante que não necessita de monitoramento laboratorial.<sup>12</sup> O dabigatran prolonga o TP e o TTPa.<sup>68,69</sup>



O rivaroxaban é administrado via oral e inibe reversivelmente o fator X ativado.<sup>12</sup> Seu pico de ação ocorre ao redor de quatro horas após a administração e tem uma vida média entre 5,7 a 9,2 horas.<sup>12</sup> O rivaroxaban prolonga o TP e o TTPa.<sup>4</sup> O dabigatran e rivaroxaban são excretados via renal e fazem bioacumulação em pacientes com insuficiência renal.<sup>12</sup>

A dosagem do fragmento 1+2 gerado durante a transformação da protrombina em trombina pode ser utilizada como marcador de estados de hipercoagulabilidade e na prevenção da trombose, porque se a concentração do fragmento 1+2 está acima do normal, significa que a trombina está sendo gerada.<sup>1</sup> A dosagem do fragmento 1+2 pode detectar ativações mínimas da cascata da coagulação. As principais indicações para a dosagem do fragmento 1+2 são as que seguem: trombose venosa profunda, coagulação intravascular disseminada, angina e monitoração da terapia com anticoagulantes orais.<sup>1</sup> Pacientes com uso de anticoagulantes orais, mesmo na vigência desses, podem fazer episódio de trombose. Com a dosagem do fragmento 1+2, os episódios de trombose podem ser prevenidos.<sup>1</sup>

A terapia fibrinolítica é baseada na administração de altas doses de ativadores do plasminogênio que aceleram a conversão do plasminogênio em plasmina, que degrada, proteoliticamente, a fibrina.<sup>12</sup> Alguns agentes fibrinolíticos são derivados de produtos bacterianos, outros são proteínas recombinantes humanas, e os primeiros podem causar reações alérgicas.<sup>12</sup> A estreptoquinase foi o primeiro ativador do plasminogênio utilizado clinicamente e é derivada do estreptococo  $\beta$ -hemolítico.<sup>12</sup> A estreptoquinase não tem atividade enzimática, mas se combina com o plasminogênio e forma um complexo (estreptoquinase-plasminogênio) que converte outras moléculas do plasminogênio em plasmina.<sup>12</sup> É usado no tratamento das trombozes arterial e venosa.<sup>12</sup> A alteplase é uma proteína recombinante do ativador tecidual do plasminogênio, conhecido como t-PA (ativador tecidual do plasminogênio).<sup>12</sup> A alteplase converte diretamente o plasminogênio em plasmina, e essa reação é acelerada em muitas vezes na presença da fibrina.<sup>12</sup> A reteplase e a tenecteplase são obtidas por tecnologia recombinante e são mutantes do t-PA; foram sintetizadas com a finalidade de melhorar as propriedades farmacológicas.<sup>12</sup>

Os agentes agregantes são classificados em quatro classes: os inibidores da ciclo-oxigenase, os agentes que aumentam a concentração do AMP cíclico, os bloqueadores dos receptores de adenosina difosfato (ADP) e os inibidores dos receptores do fibrinogênio. O ácido acetilsalicílico (AAS) é um inibidor da enzima ciclo-oxigenase e é reconhecido como um inibidor da função plaquetária desde 1960.<sup>12</sup> O ácido acetilsalicílico inibe a curva de agregação plaquetária frente aos seguintes agentes agregantes: ADP, epinefrina, colágeno e ácido aracdônico.<sup>12</sup> A ticlopidina e o clopidogrel inibem a agregação plaquetária induzida pelo ADP, são os bloqueadores dos receptores do ADP.<sup>12</sup>

## SISTEMA FIBRINOLÍTICO

### :: PLASMINOGÊNIO

O plasminogênio é uma glicoproteína (790 aminoácidos) de síntese hepática cujo gene está localizado no braço longo do cromossomo 6. Além do plasma, é encontrada na saliva, na lágrima e no líquido seminal e prostático. A forma ativa do plasminogênio (clivado na posição arginina<sub>560</sub>-valina<sub>561</sub>)<sup>1,2</sup> é a plasmina, que degrada a fibrina, gerando os produtos de degradação da fibrina.<sup>2</sup>

A concentração do plasminogênio aumenta durante os processos inflamatórios; por isso, é considerado uma proteína de fase aguda.<sup>1</sup>

O plasminogênio é um zimogênio que somente adquire atividade enzimática quando convertido à plasmina (serino-protease) pelos ativadores do plasminogênio. A ativação do plasminogênio pode-se dar por três vias: via intrínseca, via extrínseca e via exógena (agentes farmacológicos, como medicamentos trombolíticos).<sup>1</sup>

A via intrínseca está relacionada com a fase contato da coagulação sanguínea. Quando substâncias estranhas ao plasma são expostas, ocorre a ativação do fator XII, que converte o plasminogênio à plasmina. Substâncias como a pré-caliceína e os cininogênios de alto peso molecular, gerados a partir da fase contato, também são capazes de ativar o plasminogênio. A fase contato contribui com cerca de 15% da atividade fibrinolítica.

A via extrínseca é representada por dois ativadores: o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) e o ativador tipo uroquinase (u-PA).

A plasmina pode degradar fibrina, fibrinogênio e outras moléculas. O inibidor da plasmina é a



$\alpha_2$ -antiplasmina. A atividade da plasmina deve ser regulada para que não se estabeleça um quadro de fibrinogênese sistêmica.

### Ativador tecidual do plasminogênio (t-PA)

O t-PA é uma serinoprotease (530 aminoácidos), e o gene que o codifica está localizado no cromossomo 8.<sup>1</sup> O t-PA é produzido pelas células endoteliais, células musculares dos vasos sanguíneos, megacariócitos, mastócitos, monócitos e fibroblastos.<sup>1</sup> A secreção do t-PA a partir do endotélio é regulada por mediadores da coagulação sanguínea e da resposta inflamatória, como trombina, histamina, acetilcolina, bradicinina, epinefrina, interleucinas, alterações do fluxo sanguíneo e vasodilatação.<sup>1</sup> No plasma, circula complexado com o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1).<sup>1</sup> O t-PA tem sua ação enzimática bastante aumentada em presença de fibrina e transforma o plasminogênio em plasmina, com consequente degradação da rede de fibrina (fibrinólise).

### Ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA)

Foi descrito pela primeira vez na urina, onde apresenta uma concentração bastante elevada, daí o nome uroquinase.<sup>1</sup> Posteriormente, foi identificado em células renais, endoteliais, malignas, tumores e no plasma.<sup>1</sup> O gene que codifica o u-PA está localizado no cromossomo 10 e gera uma glicoproteína com 411 aminoácidos.<sup>1</sup>

### INIBIDORES DO SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Existem vários inibidores fisiológicos do sistema fibrinolítico. Localizados no sangue circulante, em células sanguíneas, tecidos e na matriz extracelular, eles podem inibir a plasmina diretamente ou impedir a ativação do plasminogênio.<sup>1</sup> São descritos quatro inibidores do sistema fibrinolítico: inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), inibidor do ativador do plasminogênio-2 (PAI-2),  $\alpha_2$ -antiplasmina e inibidores fibrinolíticos ativados pela trombina (TAFI).<sup>1</sup>

O PAI-1 está presente no sangue circulante e tem ação sobre o u-PA e t-PA, sendo o principal inibidor fisiológico do u-PA e t-PA. É sintetizado no fígado, baço, tecido adiposo e nas células do sistema vascular (células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e megacariócitos) e encontrado em maior concentração nos grânulos alfa das plaquetas.<sup>1</sup> A secreção do PA-1 é estimulada por citocinas, fatores de crescimento e proteínas

da resposta inflamatória.<sup>1</sup> É uma glicoproteína (379 aminoácidos) cujo gene está localizado no braço longo do cromossomo 7.<sup>1</sup> As deficiências do PAI-1 são raras e, no estado de homozigose, causam sangramento anormal após traumas ou cirurgias.<sup>1</sup> O PA-1 forma um complexo com o t-PA e o u-PA, inibindo a ação e clareando-os do sangue periférico.<sup>1</sup>

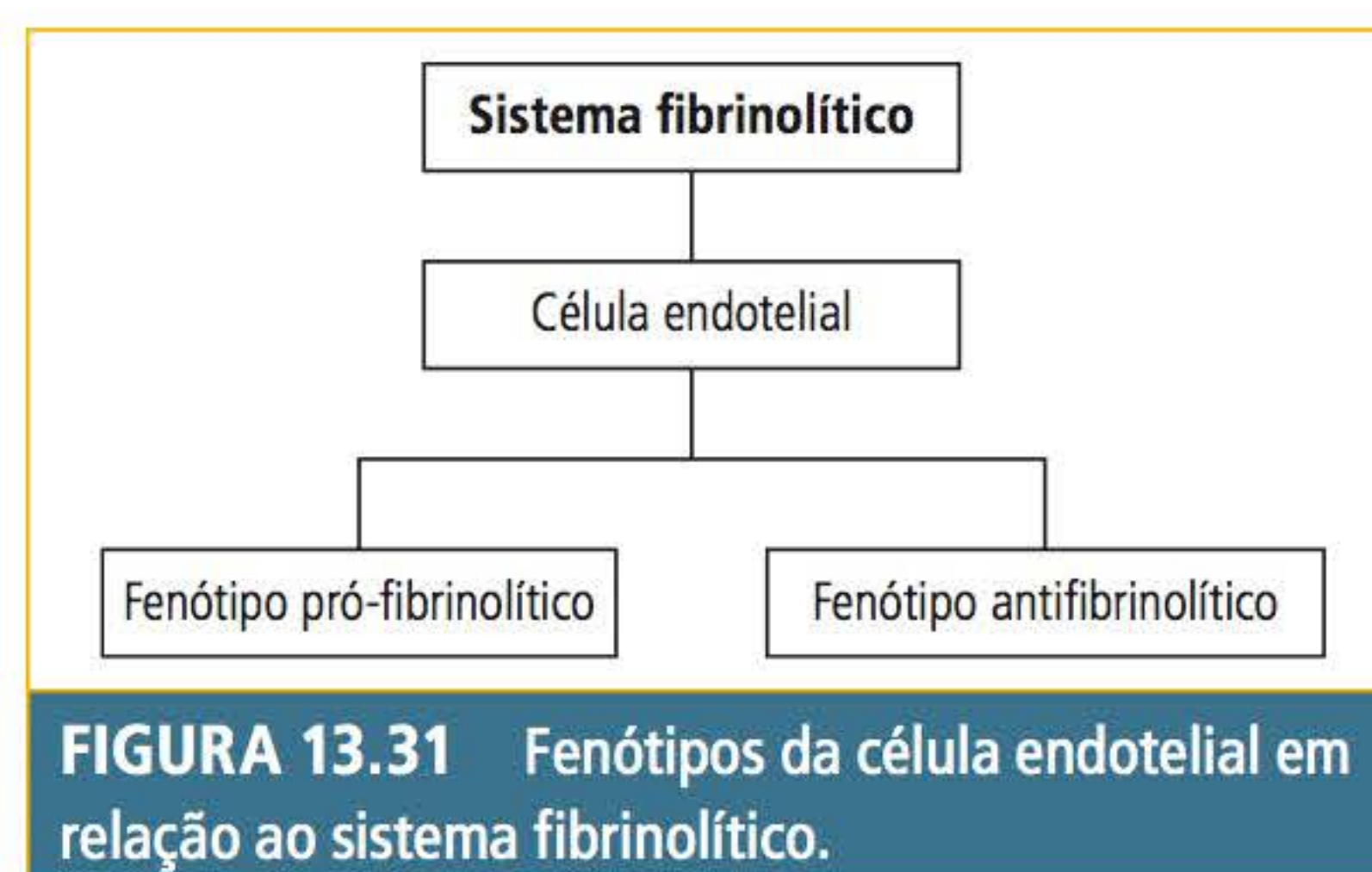
O PAI-2 é uma  $\alpha$ -globulina (393 aminoácidos), o gene que o codifica está localizado no braço longo do cromossomo 18, é sintetizado e secretado por monócitos, macrófagos, células epiteliais, como queratinócitos, certas células tumorais e pela placenta humana.<sup>1</sup>

A  $\alpha_2$ -antiplasmina é o inibidor da plasmina. É uma glicoproteína (500 aminoácidos) de síntese hepática e renal cujo gene está localizado no braço curto do cromossomo 17; tem como função a inibição da plasmina e previne a degradação sistêmica do fibrinogênio.<sup>1</sup>

O TAFI é um zimogênio de síntese hepática; o gene está localizado no cromossomo 13 e circula complexado ao plasminogênio. É ativado pelos complexos trombina-trombomodulina, meizotrombina-trombomodulina, pela plasmina e trombina, sendo que o primeiro complexo (trombina-trombomodulina) é o mais eficiente na ativação do TAFI.<sup>1</sup>

### REGULAÇÃO DO SISTEMA FIBRINOLÍTICO

A célula endotelial apresenta dois fenótipos com relação ao sistema fibrinolítico: pró-fibrinolítico e antifibrinolítico. A **Figura 13.31** representa os dois fenótipos da célula endotelial com relação ao sistema fibrinolítico.



Fonte: Adaptada de Silva e colaboradores.<sup>1</sup>

A célula endotelial em situação fisiológica está intacta e apresenta o fenótipo antifibrinolítico,



que é mantido pelo PAI-1, inibindo, desse modo, a geração de plasmina.<sup>1</sup> Outra maneira de manter o fenótipo antifibrinolítico é que, para haver a geração da plasmina, deve primeiro ser formada a fibrina, isso porque o principal ativador plasmático do plasminogênio, o t-PA, adquire sua máxima eficácia frente à fibrina e, enquanto não houver formação de fibrina, não há ativação do plasminogênio.

Quando a célula endotelial se torna ativada, duas situações ocorrem: a primeira é a exposição do fator de von Willebrand que ativa as plaquetas; a segunda é a exposição do fator tissular com consequente ativação da cascata da coagulação e formação de trombina e, então, de fibrina. A partir desse ponto, o fenótipo passa a ser pró-fibrinolítico, e a célula endotelial passa a secretar t-PA e u-PA.<sup>1</sup> O t-PA age sobre o plasminogênio, gerando a plasmina. Essa ação é mais eficiente quando o plasminogênio e o t-PA estão ligados a receptores celulares. Vários tipos de células apresentam receptores para o plasminogênio: plaquetas, monócitos, fibroblastos e células endoteliais e, quando o plasminogênio está ligado a essas células, a formação de plasmina (ação do t-PA sobre o plasminogênio) é mais rápida e fica localizada no sítio de formação da fibrina.<sup>1</sup>

Existem dois tipos de receptores para o t-PA: os receptores de ativação e os de *clearence*.<sup>1</sup> Os receptores de ativação são celulares e ligam o t-PA à superfície da célula a fim de promover a ativação do plasminogênio. Esses receptores são anexina II, heparan sulfato, condroitin sulfato, citoqueratina 8 e 18 e tubulina e estão expressos em monócitos, plaquetas, células renais e células endoteliais.<sup>1</sup> Os receptores de *clearence* têm a função de retirar da circulação e degradar o plasminogênio, controlando o nível plasmático de t-PA e do complexo t-PA/PAI-1. O *clearence* ocorre principalmente no tecido hepático e envolve os receptores de manose e  $\alpha_2$ -macroglobulina.<sup>1</sup>

As plaquetas também têm seu papel no sistema fibrinolítico, pois se ligam ao t-PA e ao plasminogênio e geram plasmina, que, na superfície da plaqueta, fica protegida da ação da  $\alpha_2$ -antiplasmina.<sup>1</sup> As plaquetas também podem inibir o sistema fibrinolítico porquê, quando ativadas, liberam PAI-1 e  $\alpha_2$ -antiplasmina, que inibem os ativadores do plasminogênio e a plasmina; a trombocitose promove um estado pró-trombótico com inibição da fibrinólise.<sup>1</sup>

A plasmina não se acumula no plasma devido à ação da  $\alpha_2$ -antiplasmina.<sup>1</sup> Ela degrada tanto o fibrinogênio quanto a fibrina. Fibrinogenólise é o termo usado para designar a degradação do fibrinogênio, e fibrinólise para designar os produtos de degradação da fibrina. A diferença molecular entre as duas situações é que, na segunda, existem as ligações cruzadas que estabilizam os monômeros de fibrina e permitem a formação da rede de fibrina. O fibrinogênio é inicialmente convertido a um fragmento chamado de X, posteriormente convertido a fragmento Y e D. O fragmento Y é convertido em fragmento D e E.<sup>1</sup> Na fibrinólise, são gerados vários fragmentos: XXD, YXY, XX, YXD, DXD, XY, XD, YY, DY e DD. A ordem em que estão descritos indica do maior tamanho (o primeiro: XXD) para o menor tamanho (o último: DD).<sup>1</sup> O D-dímero (fragmento DD) pode ser dosado e é um marcador de doença trombótica.

## DEFICIÊNCIAS DO SISTEMA FIBRINOLÍTICO

### Hemorragia e trombose

A deficiência hereditária do plasminogênio é devida a uma mutação de ponto (alanina<sub>601</sub>-treonina) e predispõe o paciente a episódios trombóticos, como tromboflebite, trombose venosa mesentérica e intracranial e embolia pulmonar.<sup>3</sup> Pode-se ter a deficiência adquirida do plasminogênio na doença hepática e na septicemia.<sup>3</sup> A predisposição é para eventos trombóticos,<sup>70</sup> pois toda vez que for gerada a rede de fibrina, ela não é degradada e clareada, uma vez que a forma ativa do sistema fibrinolítico é a plasmina, o que não ocorre em razão da falta do plasminogênio.

A deficiência congênita do plasminogênio pode ser de dois tipos: tipo I e tipo II.<sup>71</sup> O tipo I caracteriza-se por apresentar diminuição na atividade e na concentração molecular, o tipo II apresenta atividade diminuída; esses pacientes tem tendência à trombose.<sup>3</sup>

Pacientes com deficiência adquirida ou congênita dos inibidores do sistema fibrinolítico têm uma predisposição a hemorragia, porque o plasminogênio continuará sendo transformado em plasmina com dissolução do coágulo formado.<sup>3</sup> A gestante, apesar de ter concentrações aumentadas de plasminogênio e fibrinogênio (a concentração plasmática das duas proteínas aumenta em cerca de 50 a 60% durante o terceiro trimestre da gestação),<sup>10</sup> tem um estado hipofibrinolítico.<sup>72</sup>



A atividade do sistema fibrinolítico está diminuída, caracterizando a gestação como um estado de hipercoagulabilidade secundário, que pode ou não se manifestar com a ocorrência de episódios trombóticos.<sup>1</sup>

AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

Os fatores da coagulação podem ser avaliados pelo TP e pelo TTPa, considerados como testes de *screening* para avaliação da coagulação sanguínea. Na fase pré-analítica, estão descritos o anticoagulante de escolha para avaliação dos fatores da coagulação, a relação sangue: anticoagulante ideal e a correção do anticoagulante quando o volume globular está fora da variação permitida.

TEMPO DE PROTROMBINA (TP)

Quando um *kit* para a realização do TP é adquirido, a primeira preocupação deve ser com o valor do índice de sensibilidade internacional (ISI), porque a partir dele, será calculado o valor da relação normatizada internacional (RNI). Outra preocupação é com o controle normal, que será utilizado para avaliar a atividade da tromboplastina (reativo do TP) e como o resultado do TP será liberado. Por fim, deve-se conhecer o princípio do teste para saber quais os fatores da coagulação que são medidos pelo TP. A **Figura 13.32** resume o que deve ser feito quando se adquire um *kit* para a realização do TP.

Um dos trabalhos mais relevantes para a anti-coagulação oral foi o artigo publicado por Hull e colaboradores<sup>73</sup> em 1982, que demonstrou que as tromboplastinas não têm a mesma sensibilidade. Existem tromboplastinas que são menos sensíveis

à redução de atividade dos fatores dependentes de vitamina K, o que leva a uma diferença significativa no valor do TP, dependendo da tromboplastina que é utilizada.<sup>74</sup> Em função disso, a partir de 1983, o monitoramento da terapia com anticoagulante oral (varfarina) passou a ser feito pelo valor da RNI.<sup>74</sup> O problema da diferença de sensibilidade entre as tromboplastinas foi resolvido com a adoção de um sistema no qual as tromboplastinas comerciais são comparadas com uma tromboplastina de padrão internacional. Para a tromboplastina de padrão internacional, convencionou-se um índice de sensibilidade igual a 1 que permite o cálculo de um índice de sensibilidade para as tromboplastinas comerciais, o qual foi designado como índice de sensibilidade internacional (ISI). A Organização Mundial da Saúde (OMS) adota esse sistema e mantém reagentes de padrão internacional que permitem estabelecer o valor do ISI para as tromboplastinas comerciais.

Todo *kit* de tromboplastina cálcica comercial tem o valor do índice de sensibilidade internacional (ISI) que indica a qualidade da tromboplastina: quanto maior o ISI, menor a sensibilidade da tromboplastina. A tromboplastina comercial é calibrada com o ISI pela Organização Mundial da Saúde. O ISI é um sistema de calibração baseado em uma relação linear entre o logaritmo (log) da relação de tempos da tromboplastina comercial e a tromboplastina de referência internacional (que tem um ISI = 1).

Para se obter a relação de tempos, é feito o TP da tromboplastina de referência e da tromboplastina comercial a partir de um grupo de voluntários normais e de um grupo de voluntários que receberam, durante duas semanas, anticoagulante oral.

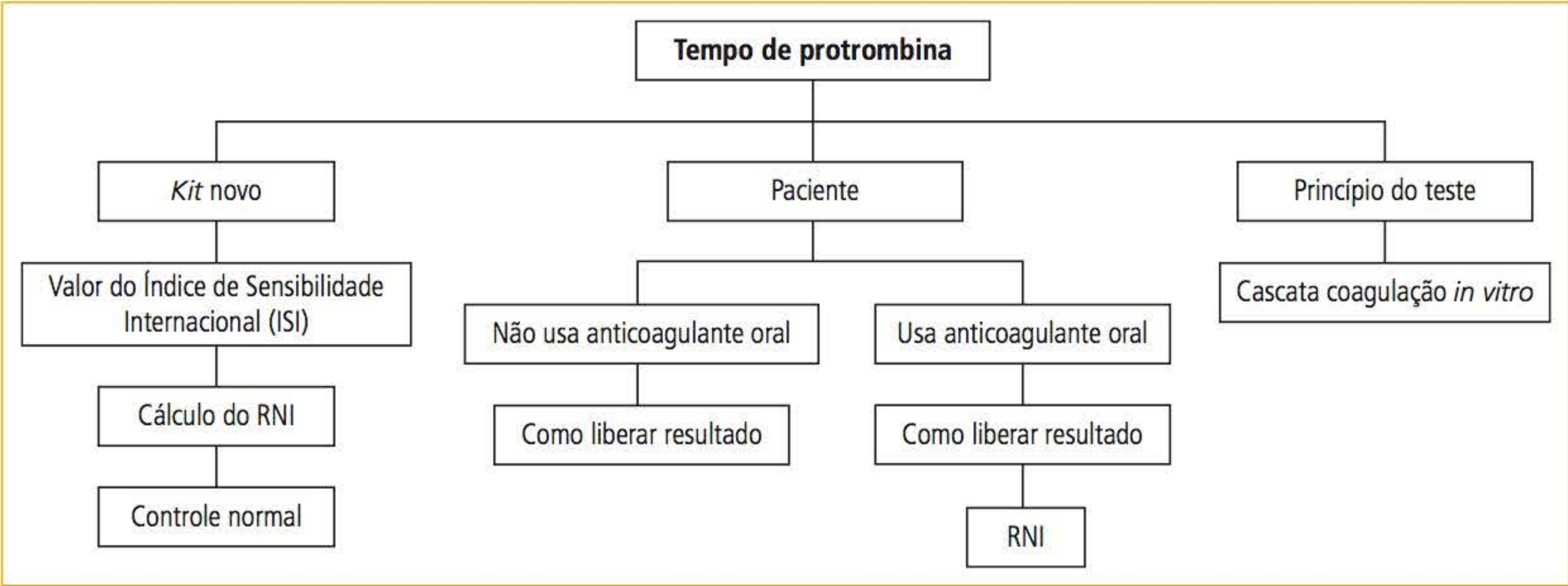


FIGURA 13.32 O que deve ser feito após a aquisição de um *kit* para a realização do tempo de protrombina.







faz uso de anticoagulante oral, o resultado do TP deve ser expresso em segundos, juntamente com o valor do controle normal e da relação normatizada internacional (RNI). A liberação do TP em porcentagem é considerada obsoleta e não deve constar no laudo. Quanto maior o valor do RNI, mais anticoagulado o paciente está.

O TP é o teste de escolha para controle dos anticoagulantes orais (varfarinas) porque a formação do coágulo de fibrina inicia pela ativação do fator VII, que é um fator dependente de vitamina K. O anticoagulante oral inibe a síntese da vitamina K e, sem ela, os fatores II, VII, IX e X não podem ser ativados. A concentração plasmática do anticoagulante oral é proporcional à deficiência da vitamina K (quanto maior a concentração do anticoagulante, maior a deficiência da vitamina K e mais elevado o TP). Como a tromboplastina ativa direta e exclusivamente o fator VII, a deficiência deste é diretamente proporcional à concentração do anticoagulante e, por isso, é o teste de escolha para monitorar a terapia com anticoagulantes orais (varfarina). O TP não tem valor para monitorar a heparinoterapia, o qual pode estar alterado, mas não se pode estabelecer uma relação dose/elevação do TP.

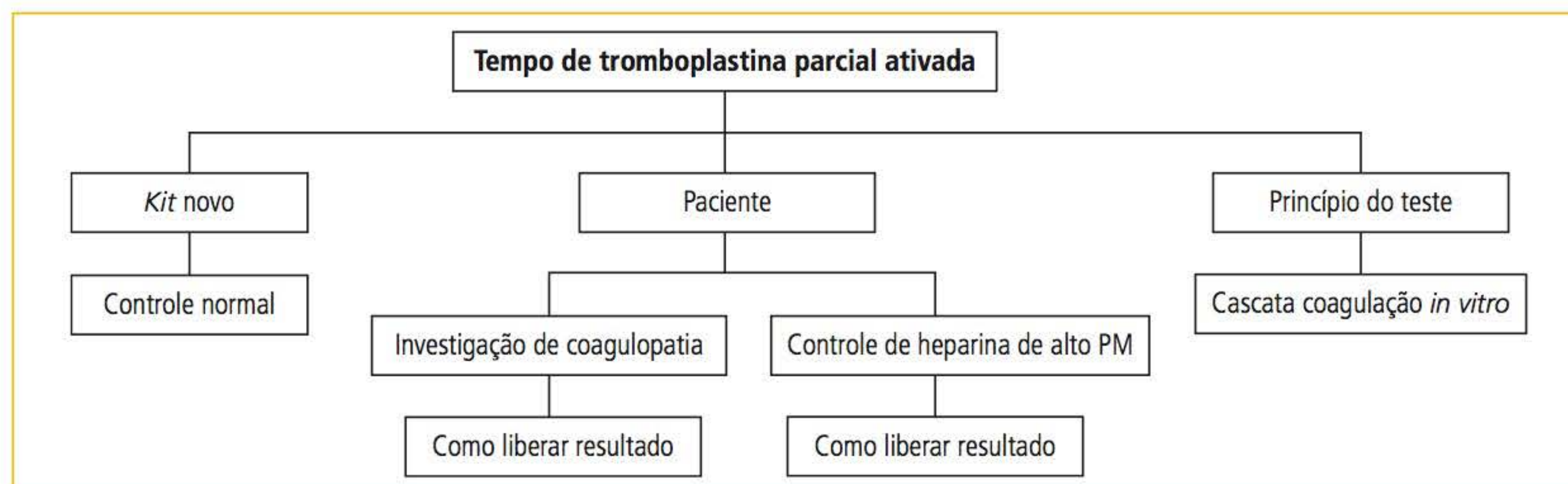
Durante o monitoramento do anticoagulante oral, o horário da coleta é importante. O pico de inibição da vitamina K e consequente aumento do TP se dá entre 4 e 8h horas, e o pico mais baixo de inibição ocorre entre 18 e 24h horas. É interessante que durante o monitoramento seja padronizado o horário da coleta do TP.

## TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (TTPa)

O TTPa é também chamado de KPTT (tempo de tromboplastina parcial ativada pelo kaolin, do inglês *kaolin-activated partial thromboplastin time*)

e TTP (tempo de tromboplastina parcial). Se for coletado sangue (com citrato de sódio a 0,106 M), não ocorrerá a formação de coágulo. Se o sangue for centrifugado, o plasma separado, e a este se adicionar cálcio, haverá formação de um coágulo de fibrina. Esse procedimento é chamado de tempo de recalcificação do plasma (TRP), um teste demorado porque deve ocorrer a ativação dos fatores da fase contato (XII, XI, PK e HK) para o posterior desencadeamento da cascata da coagulação. Para que o TRP ficasse mais rápido e pudesse ser utilizado como um teste de coagulação, duas modificações foram feitas: adição de cefalina (fosfolípideo substituto das plaquetas) e de um ativador da fase contato da coagulação. O primeiro ativador utilizado foi o kaolin, e o teste passou a se chamar de tempo de tromboplastina parcial ativada pelo kaolin (KPTT). Posteriormente, o kaolin foi substituído pelo ácido elágico, um ativador melhor porque não sedimenta e pode ser adicionado ao reativo. A nomenclatura passou a ser TTPa para diferenciar do teste que usava o kaolin (KPTT). Como hoje todas as cefalinas vêm adicionadas ao ativador, o teste passou a ter a nomenclatura TTPa. A **Figura 13.34** esquematiza o procedimento a ser adotado quando um *kit* de TTPa é adquirido.

Todo o procedimento pré-analítico e analítico descrito para o TP deve ser seguido para o TTPa. A diferença é que o TTPa não utiliza valores de RNI e nem é avaliado pelo ISI. Após a aquisição do *kit*, deve-se saber qual a atividade da cefalina e do ativador, ou seja, qual o valor (em segundos) do controle normal. O controle normal para o TTPa é o mesmo descrito para o TP; pode ser utilizado um controle comercial ou um *pool* de plasma normal, feito a partir de cinco amostras.<sup>75</sup> Do mesmo modo que o TP, o TTPa deve ser realizado por automação.



**FIGURA 13.34** Procedimento a ser adotado quando um *kit* de TTPa é adquirido.



A técnica consiste em deixar o reativo (cefalina + ativador), o plasma do paciente, o controle normal e o cloreto de cálcio em banho-maria entre 3 a 5 minutos. Posteriormente, adicionar o plasma ao reativo e marcar o tempo de três minutos; após esse tempo, adicionar o cloreto de cálcio e marcar o tempo de formação do coágulo.

Princípio do teste

Os fatores da fase contato (XII, XI, HK e PK) são ativados pelo ativador e ativam o fator IX, que, quando ativado, ativa o fator X. O fator X ativado transforma a protrombina em trombina. A quantidade de trombina gerada não sustenta a formação do coágulo, mas é suficiente para ativar os fatores VIII, V e XI. O fator VIII ativado se complexa com o fator IX sobre a cefalina, que faz o papel das plaquetas. Esse complexo (VIIIa + IXa + cefalina) ativa de modo definitivo o fator X. O fator X ativado complexa-se com o fator V ativado sobre a cefalina e ativa a protrombina de tal modo que a cascata da coagulação se torna autocatalítica. O coágulo não é formado porque o cálcio não se faz presente. Todos os fatores estarão ativados no tempo de espera de três minutos; quando o cálcio (cloreto de cálcio) for adicionado, a rede de fibrina será formada. A **Figura 13.35** mostra a cascata da coagulação no TTPa.

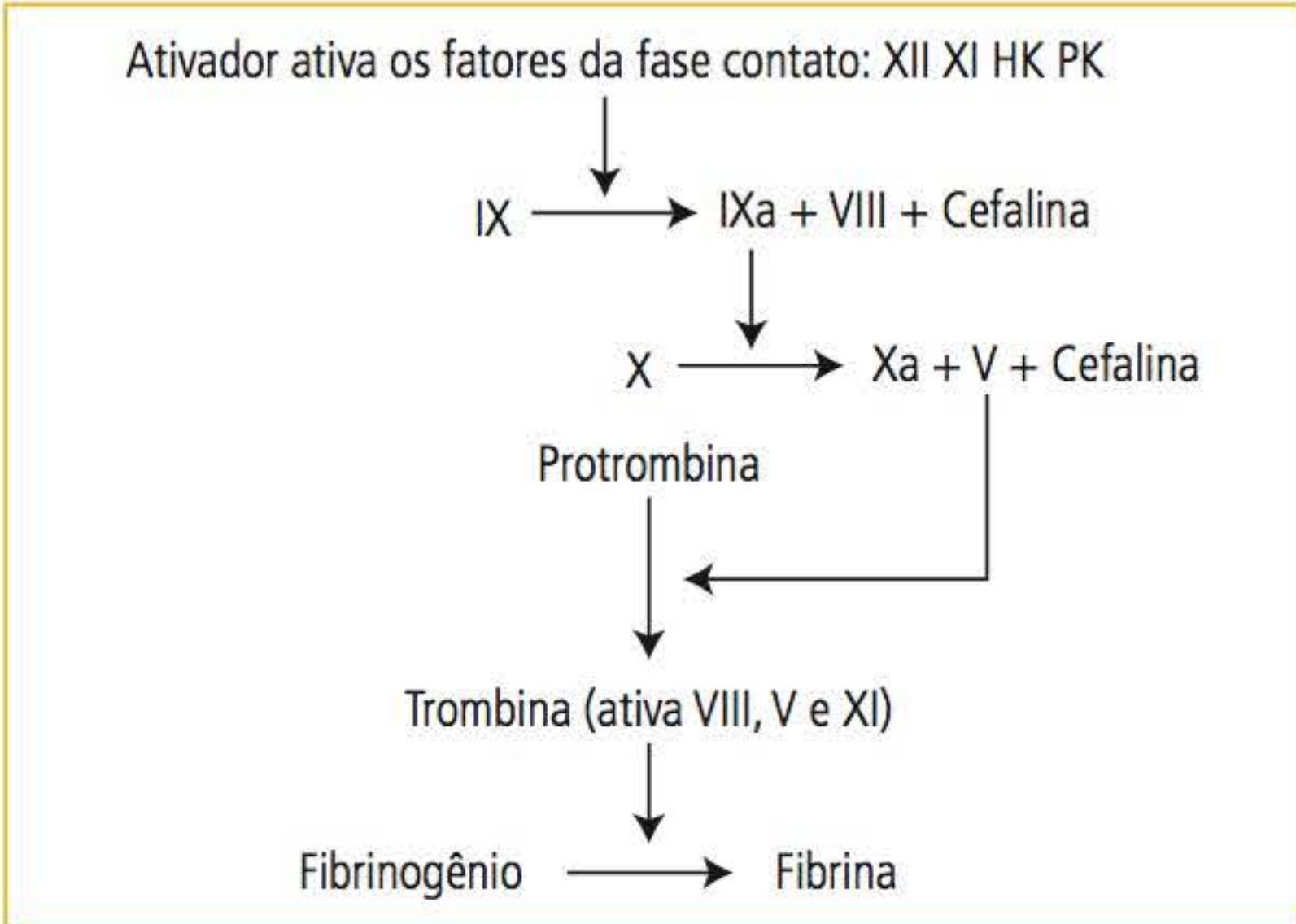


FIGURA 13.35 Cascata da coagulação no TTPa.

Resultado do TTPa

O resultado do TTPa do paciente deve ser dado em segundos e deve ser comparado com o valor do controle normal. O valor de referência é o controle normal ± 5 segundos. O TTPa é utilizado como teste pré-operatório, para a investigação de coagulopatias e para o monitoramento da heparinoterapia quando se utiliza heparina de alto peso

molecular (ver controle da terapia antitrombótica). O TTPa não é indicado para o monitoramento de heparina de baixo peso molecular. O **Quadro 13.3** mostra os fatores medidos apenas pelo TP, os medidos apenas pelo TTPa e os fatores medidos pelos dois testes.

QUADRO 13.3 Fatores medidos pelo TP, pelo TTPa e pelos dois testes		
FATORES MEDIDOS PELO TP	FATORES MEDIDOS PELO TTPa	FATORES MEDIDOS PELO TP E TTP
VII	HK	X
	PK	V
X	XII	II
V	XI	I
II	IX	
I	VIII	
	X	
	V	
	II	
	I	

É muito raro que um paciente apresente deficiência de dois fatores; por isso, quando o TP e o TTPa estão alterados, pensa-se em fatores da via comum (medidos pelos dois testes). Quando o TP está normal e o TTPa está alterado, a deficiência pode ser do fator XII, XI, IX, VIII, HK ou PK. O tipo de doença hemorrágica (clínica do paciente) é muito importante porquê, nas deficiências de fator XII, XI, HK e PK, o indivíduo não apresenta doença hemorrágica, com exceção do fator XI em determinadas situações (ver coagulopatias hereditárias – deficiência do fator XI). Nas hemofilias graves, hematomas e hemartroses ocorrem espontaneamente desde a infância; nas moderadas, os hematomas são secundários a traumas e cirurgias, e as hemartroses são ocasionais. Um teste bastante simples para saber se a deficiência é de um fator da coagulação ou se a alteração é devida à presença de anticoagulante ou inibidor consiste em misturar o plasma do paciente com um *pool* de plasma normal na proporção de 1:1, deixar em banho-maria a 37 °C por duas horas e fazer o TTPa da mistura. Se houver a correção, a deficiência é de fator da coagulação; caso contrário, o TTPa está alterado devido à presença de anticoagulante ou inibidor. A confirmação de qual fator está deficiente pode ser feita laboratorialmente pela dosagem dos fatores da coagulação.

A **Figura 13.36** mostra esquemas que podem ajudar a estabelecer o diagnóstico laboratorial



quando o TP, o TTPa ou a contagem de plaquetas mostra alguma alteração; foram adaptados de Lichman e colaboradores.<sup>12</sup>

TEMPO DE TROMBINA (TT)

Para a realização do TT, adiciona-se ao plasma citratado uma solução de trombina, a qual atua sobre o fibrinogênio e promove a formação do coágulo de fibrina. O tempo de formação do coágulo é rápido, o controle normal é de cerca de 10 a 15 segundos. O TT permite avaliar as deficiências de

fibrinogênio e a presença de anticoagulantes, como da heparina, que é uma antitrombina. O TT também pode estar prolongado quando há ativação do sistema fibrinolítico; a plasmina cliva o fibrinogênio e a fibrina.

DOSAGEM DO FIBRINOGÊNIO (FBG)

No coagulograma de rotina (pré-operatório), não é solicitada a dosagem de fibrinogênio, mas pode-se ter uma ideia da concentração do fibrinogênio pela observação do coágulo no TP ou TTPa. Um

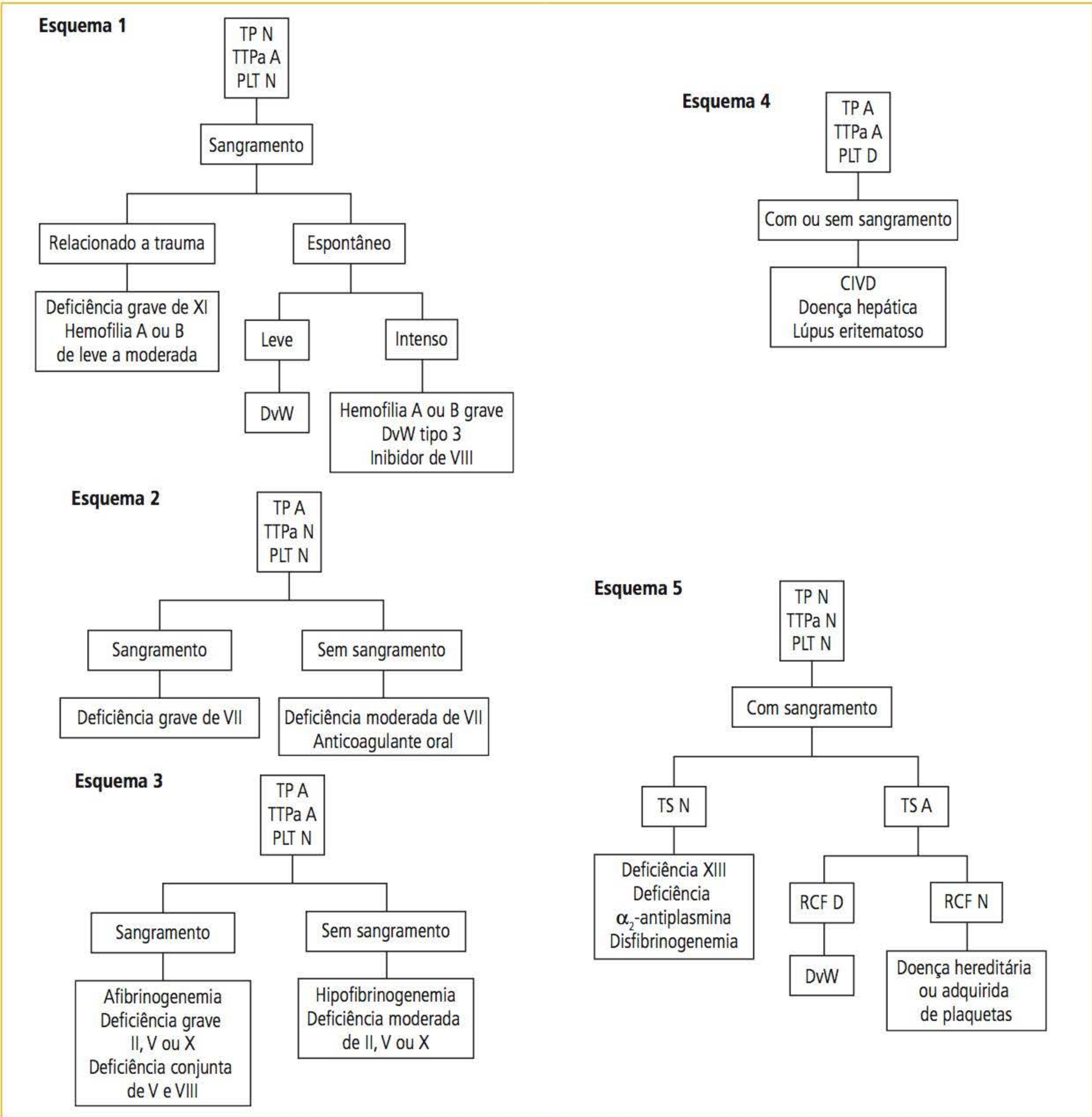


FIGURA 13.36 Esquemas que tentam estabelecer um diagnóstico laboratorial quando o TP, o TTPa ou a contagem de plaquetas mostra alguma alteração.

TP, tempo de protrombina; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativada; PLT, plaquetas; N, normal; A, aumentado; D, diminuído; DvW, doença de von Willebrand; VK, vitamina K; TS, tempo de sangramento; RCF, curva de agregação plaquetária frente à ristocetina.



coágulo firme, bem-formado e que ocupa quase todo o volume da mistura plasma e reagente denota uma concentração normal de fibrinogênio. A dosagem de fibrinogênio se torna importante em situações de consumo de fatores de coagulação, como na CIVD (coagulação intravascular disseminada) ou situações de ativação do sistema fibrinolítico. O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda que está aumentado em situações inflamatórias e durante a gestação. O aumento da concentração plasmática do fibrinogênio favorece a formação de *roleaux* eritrocitário por interferir no potencial zeta eritrocitário, elevando a VHS.

O valor de referência varia de 150 a 450 mg/dL. O fibrinogênio pode ser medido de modo manual ou automatizado, com preferência para o último. Um método bastante utilizado é o de Clauss (descrito em 1957),<sup>77</sup> que consiste em diluir o plasma em um tampão e acrescentar uma solução de trombina, a qual promoverá a formação do coágulo de fibrina com turvação da solução, lida em espectrofotômetro. A turvação é proporcional à concentração de fibrinogênio. Esse não é um teste ideal para as disfibrinogenemias porque dará um valor baixo de fibrinogênio, simulando um quadro de hipofibrinogenemia ou afibrinogenemia. Nas disfibrinogenemias, a concentração de fibrinogênio é normal, mas a molécula é alterada. Para diferenciar disfibrinogenemias de hipo ou afibrinogenemia, as técnicas imunológicas são melhores. O ideal é a associação dos dois testes (atividade e antigenicidade).

## ■ D-DÍMERO

A geração da fibrina e, conseqüentemente, de seus produtos de degradação (D-dímero) está aumentada na embolia pulmonar, trombose venosa profunda (TVP) e coagulação intravascular disseminada (CIVD). Pelos níveis plasmáticos do D-dímero, pode-se monitorar a diminuição do tamanho do trombo e a eficácia da heparinoterapia. Atualmente, com o uso de anticorpos monoclonais, o D-dímero pode ser dosado diretamente no sangue total,<sup>3</sup> pode ser medido por aglutinação de látex<sup>1</sup> e por ELISA.<sup>55</sup>

## ■ DOSAGEM DOS FATORES DA COAGULAÇÃO

Quando se tem a necessidade de dosar algum fator de coagulação porque os exames de triagem estavam alterados, pode-se utilizar a técnica do TP ou do TTPa (dependendo de qual fator se

queira dosar). O plasma do paciente é misturado a um plasma (adquirido no comércio) deficiente somente do fator que se quer dosar. A coagulação ocorrerá em função da presença do fator a ser dosado no plasma do paciente. Considerando um plasma deficiente de fator VIII e com os demais fatores normais, quando ele for misturado ao plasma do paciente, a concentração de fator VIII na mistura é dependente da concentração de fator VIII no plasma do paciente. Uma curva de concentração de fator VIII é feita a partir de um plasma de referência (adquirido no comércio) e mede-se a concentração de fator VIII no plasma do paciente a partir da realização do TTPa. A dosagem específica de fatores da coagulação pode ser feita de modo manual ou automatizado.

## REFERÊNCIAS

1. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. Hematologia laboratorial. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.
2. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, et al. Hematology: basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.
3. Lichtmann MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006.
4. Kubitz D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehlsdorf M. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939- an oral, direct Factor Xa inhibitor-after multiple dosing in healthy male subjects. Eur J Clin Pharmacol. 2005;61(12):873-80.
5. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII: correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. Biochemistry. 1986;25(2): 505-12.
6. Regan LM, Fay PJ. Cleavage of factor VIII light chain is required for maximal generation of factor VIIIa activity. J Biol Chem. 1995;270(15):8546-52.
7. Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. J Biol Chem. 1991;266(3):20139-45.
8. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature. 2001;413(6855):488-94.
9. Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. Blood. 2001;98(6):1654-61.
10. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, et al. ADAMTS13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. Blood. 2002;100(12):4033-4.
11. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.



12. Lichtman MA, Kaushansky K, Kipps TJ, Prchal JT, Levi. Williams hematology. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
13. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(9):1381-9.
14. Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(1):170-7.
15. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cells to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7(4):459-64.
16. Veltkamp JJ, Meilof J, Remmelts HG, van der Vlerk D, Leliger EA. Another genetic variant of haemophilia B: Haemophilia B Leyden. *Scand J Haematol*. 1970;7(2):82-90.
17. Hamaguchi N, Roberts H, Stafford DW. Mutations in catalytic region of factor IX that are related to the subclass hemophilia Biochemistry. 1994;32(25):6324-9.
18. Bolton-Maggs PH, Young Wan-Yin B, McCraw AH, Slack J, Kernoff PB. Inheritance and bleeding in factor XI deficiency. *Br J Haematol*. 1988;69(4):521-8.
19. Ichinose, A. Physiopathology and regulation of factor XIII. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):57-65.
20. Medicina D, Fabbretti G, Brennan SO, George PM, Kudryk B, Callea F. Genetic and immunological characterization of fibrinogen inclusion bodies in patients with hepatic fibrinogen storage and liver disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:522-5.
21. Brennan SO, Wyatt J, Medicina D, Callea F, George PM. Fibrinogen Brescia: Hepatic endoplasmic reticulum storage and hypofibrinogenemia because of a g284 Gly<sup>Arg</sup> mutation. *Am J Path*. 2000;157(1):189-96.
22. Galanakis DK. Fibrinogen anomalies and disease. A clinical update. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1992;6(5):1171-87.
23. von Willebrand EA. Hreditär pseudohemofili. *Fin Laekaresaellk Hand*. 1926;68:87.
24. Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 2000;84(2):160-74.
25. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 1994;71(4):520-5.
26. Howard MA, Firkin BG. Ristocetin-a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh*. 1971;26(2):362-9.
27. Committee on Nutrition, American Academy of Pediatrics. Vitamin K supplementation for infants receiving milk substitute infant formulas and for those with fat malabsorption. *Pediatrics*. 1971;48(3):483-7.
28. Shapiro SS, Hultin M. Acquired inhibitors to the blood coagulation factors. *Semin Thromb Haemost*. 1975;1:336-85.
29. Feinstein DI, Rapaport S. Acquired inhibitors to the blood coagulation. *Prog Hemost Thromb*. 1972;1:75-95.
30. Stricker RB, Barlogie B, Kiproff DD. Acquired factor VIII inhibitor associated with chronic interferon-alpha therapy. *J Rheumatol*. 1994;21(2):350-2.
31. Ries M, Wölfel D, Maier-Brandt B. Severe intracranial hemorrhage in a newborn infant with transplacental transfer of an acquired factor VIII:C inhibitor. *J Pediatr*. 1995;127(4):649-50.
32. Hauser I, Schneider B, Lechner K. Pos-partum factor VIII inhibitors: a review of the literature with special reference to the value of steroid and immunosuppressive treatment. *Thromb Haemost*. 1995;73(1):1-5.
33. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Proceedings: a more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975;34(2):612.
34. Bodnar M, Henneberg R, Frigeri HR, Silva PH. Laboratory diagnosis of syndrome antiphospholipid. *J Biotechnol Biodiversity*. 2012;3:4.
35. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J*. 1983;287(6399):1088-9.
36. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the of the classification criteria for define antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):295-306.
37. Wassemann A, Neisser A, Bruck C. Einse serediagnostische reaktion bei syphilis. *Deutsche Med Wochenschr*. 1906;32:745-6.
38. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1983;2(8361):1211-4.
39. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1952;31:621-2.
40. Levine JS, Rauch J, Branch DW. Antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2002;346(10):752-63.
41. Quaió CRC, Grando PED, Carvalho JF. Estudo comparativo entre a síndrome antifosfolípide primária e a secundária: características clínico-laboratoriais em 149 pacientes. *Rev Bras Reumatol*. 2008;48:329-34.
42. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1992;19:508-12.
43. Devreese K, Hoylaerts MC. Challenges in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Clin Chem*. 2010;56(6):930-40.
44. Thiagarajan P, Pengo V, Sapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulant. *Blood*. 1986;68:869-74.
45. WerfenLife Group Headquarters. WerfenLife [Internet]. Barcelona: Werfenlife; c2014 [capturado em 13 maio 2015]. Disponível em: <http://www.werfenlife.com/>.
46. Neame PB, Kelton JG, Walker IR, Stewart IO, Nossel HL, Hirsh J. Thrombocytopenia in septicemia: The role of disseminated intravascular coagulation. *Blood*. 1980;56(1):88-92.
47. Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. Toward definitions, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 2001;86(5):1327-30.
48. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*. 1981;68(5):1370-3.
49. Miletich J, Sherman L, Broze G. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med*. 1987;317(16):991-6.
50. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost*. 1995;73(1):87-93.







Os conhecimentos na área de imuno-hematologia eritrocitária propiciaram uma transfusão sanguínea mais segura e melhoraram o diagnóstico laboratorial de quadros potencialmente graves e fatais como a doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFN) e a anemia hemolítica autoimune (AHAI).

Entre os avanços científicos observados desde o início do século passado, podem ser destacados a descoberta do grupo sanguíneo ABO por Karl Landsteiner, em 1900, a descoberta do antígeno RhD em 1939, o teste de Coombs em 1945, o gel-teste em 1990, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra antígenos eritrocitários e a genotipagem dos grupos sanguíneos nos últimos 20 anos.

O profissional que deseja realizar testes imuno-hematológicos com qualidade e segurança deve ter em mente a necessidade de acompanhar o avanço científico e implantar técnicas adequadas à rotina do laboratório, escolher reagentes apropriados e aumentar a segurança para o paciente.

Apesar de os testes imuno-hematológicos de rotina serem relativamente fáceis de executar, é importante destacar que um erro laboratorial pode causar danos graves ou até o óbito do paciente. Nos Estados Unidos, a terceira maior causa de morte pós-transfusional são os anticorpos antieritrocitários não-ABO que deveriam ser detectados no teste da antiglobulina indireto (Coombs indireto). Entre os anos de 2009 a 2013, a incompatibilidade ABO foi observada em 31% dos casos de morte pós-transfusional relacionada a anticorpos antieritrocitários. A gravidade e o risco são mais bem representados com exemplos. Uma classificação incorreta de uma gestante RhD negativo como RhD positivo levaria à não realização da imunoprofilaxia Rh, e a gestante poderia produzir anti-D desencadeando, no seu segundo filho, a DHFN, um quadro grave e potencialmente fatal. O resultado de uma tipagem ABO de um indivíduo A<sub>x</sub>B (subgrupo A fraco) interpretado apenas com a prova direta, sem a realização da prova reversa para confirmar, poderia ser equivocadamente liberado como B porque o anti-A pode não aglutinar eritrócitos do subgrupo A fraco. A realização do teste da antiglobulina humana com eritrócitos do grupo O não fenotipadas poderia não detectar anti-K na gestante e levar ao desenvolvimento de DHFN grave.

Nesse cenário de grandes riscos, este capítulo é dedicado aos profissionais que realizam os testes imuno-hematológicos no laboratório de análises clínicas. Perseguindo a qualidade dos testes, visando à segurança dos pacientes e com o objetivo de resguardar o laboratório e os profissionais, será discutida a aglutinação eritrocitária, os sistemas de grupos sanguíneos ABO e Rh, a tipagem sanguínea ABO e RhD, a aloimunização eritrocitária, o teste da antiglobulina humana (teste de Coombs), os principais métodos imuno-hematológicos e a importância do controle de qualidade em imuno-hematologia. No final do capítulo, estão descritas as técnicas mais comumente utilizadas no laboratório, sempre acompanhadas de notas para auxiliar na sua execução. Outras técnicas complementares



não descritas podem ser encontradas em *guidelines* e manuais técnicos. Mesmo utilizando as melhores técnicas e controles de qualidade, em caso de resultado discrepante, uma estratégia é recorrer aos profissionais dos hemocentros, que são especializados nessa área e podem realizar técnicas complementares para auxiliar na elucidação e resolução da dificuldade.

### AGLUTINAÇÃO ERITROCITÁRIA (HEMAGLUTINAÇÃO)

O resultado no laboratório de imuno-hematologia é baseado na hemólise e/ou aglutinação eritrocitária, que pode ser específica ou inespecífica. A hemaglutinação verdadeira (específica) ocorre pela ligação de um anticorpo a um antígeno eritrocitário específico, enquanto as aglutinações inespecíficas são decorrentes de situações patológicas. Os testes laboratoriais devem ser capazes de diferenciar a hemaglutinação verdadeira das aglutinações eritrocitárias inespecíficas. Para tanto, devem ser incluídos na rotina laboratorial controles da reação antígeno-anticorpo.

A aglutinação eritrocitária pode ser explicada pelo modelo físico-químico conhecido como Potencial Zeta. Os eritrócitos têm cargas eletronegativas pela presença de sialoglicoproteínas na membrana e permanecem separados quando em solução salina (NaCl a 0,9%). O Potencial Zeta (Z) é a diferença de potencial criada entre a nuvem de cátions sódio (Na<sup>+</sup>) atraída pela carga eletronegativa da membrana eritrocitária e o meio. O Potencial Zeta é definido pela equação de Pollack:

$$Z = \frac{\gamma}{D\sqrt{\mu}}$$

$\gamma$  é a carga elétrica eritrocitária  
 $\mu$  é a força iônica  
 $D$  é a constante dielétrica do meio

Fonte: Girello e Kühn.<sup>1</sup>

A aglutinação eritrocitária ocorre quando o sistema atinge o Potencial Zeta Crítico ( $Z_{\text{crítico}}$ ). Anticorpos fixados na membrana eritrocitária diminuem o Z pela neutralização das cargas negativas até atingir o  $Z_{\text{crítico}}$ .

Os anticorpos de maior importância clínica em imuno-hematologia são das classes IgM e IgG (IgG1 e IgG3). Quando anticorpos da classe IgM se ligam à membrana eritrocitária, o meio atinge o  $Z_{\text{crítico}}$  e ocorre hemaglutinação. Assim, anticorpos

IgM geralmente são considerados aglutinantes por causar hemaglutinação na fase de centrifugação imediata (aglutinação direta, não necessitando da fase da antiglobulina humana). Anticorpos da classe IgG sensibilizam os eritrócitos, mas o  $Z_{\text{crítico}}$  não é atingido. Por essa característica, anticorpos IgG são geralmente não aglutinantes (incompletos) e necessitam da adição do soro de Coombs (anti-IgG humana) para serem detectados por hemaglutinação.

Na prática laboratorial, o Z pode ser alterado pelo tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas (papaína, bromelina), que reduzem a carga elétrica eritrocitária ( $\gamma$ ) pela clivagem de glicoproteínas da membrana eritrocitária. Eritrócitos são tratados com enzima para potencializar a reação antígeno-anticorpo (ex. anti-D, anti-c, anti-e entre outros). Os aditivos macromoleculares empregados no teste da antiglobulina (albumina bovina e polietilenoglicol) alteram a constante dielétrica do meio (D), potencializando a reação antígeno-anticorpo. A reação antígeno-anticorpo também é potencializada com a adição de solução salina de baixa força iônica (LISS, do inglês *low-ionic-strength saline*), aumentando o Z com a diminuição da força iônica ( $\mu$ ), o que facilita a ligação dos anticorpos no eritrócito. Todas essas estratégias têm o objetivo de potencializar as reações de hemaglutinação em busca de resultados claros e indubitáveis.

### GRADUAÇÃO DA REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO E ESCORE NUMÉRICO

A leitura da reação de hemaglutinação deve ser padronizada, e todos os profissionais do laboratório devem ter a mesma interpretação. Após centrifugado, o tubo é agitado suavemente para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a reação antígeno-anticorpo. A reatividade deve ser avaliada após a completa ressuspensão do botão de eritrócitos formado com a centrifugação. A ausência de hemaglutinação é classificada como 0 (zero). A graduação da reação de aglutinação varia de w+ (reação fraca – w, do inglês *weak*) a 4+, de acordo com os aglutinados observados. O escore numérico é atribuído de acordo com a intensidade da aglutinação eritrocitária. Por exemplo, uma reação de aglutinação de 4+ corresponde a um escore numérico igual a 12. A **Tabela 14.1** mostra a interpretação da reação de aglutinação eritrocitária em tubo e microplaca.



**TABELA 14.1** Interpretação da reação de aglutinação eritrocitária em tubo e microplaca

RESULTADOS OBSERVADOS MACROSCOPICAMENTE	GRADUAÇÃO	SCORE
Um aglutinado sólido	4+	12
Vários aglutinados grandes	3+	10
Aglutinados de tamanho médio, fundo claro	2+	8
Aglutinados pequenos, fundo róseo	1+	5
Aglutinação pouco visível, fundo avermelhado	w+ ou +/-	2
Ausência de aglutinação	0	0

**Nota:** A reatividade deve ser avaliada após homogeneização suave e completa ressuspensão do botão de eritrócitos formado com a centrifugação w+ ou +/- = reação fraca.

**Fonte:** Adaptada de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>

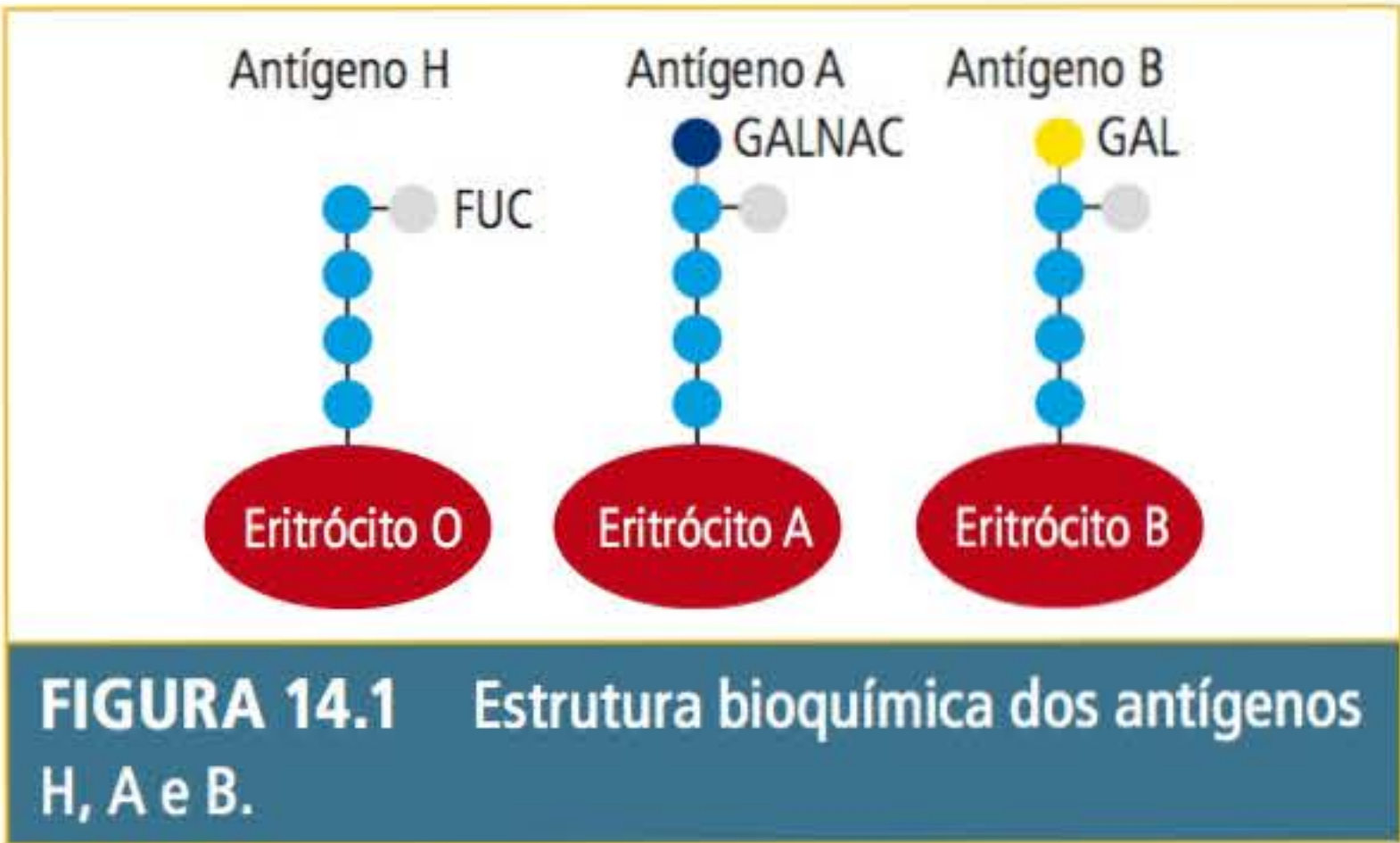
SISTEMA ABO

O sistema ABO é o mais importante na medicina transfusional. Os anticorpos envolvidos na incompatibilidade ABO pós-transfusional são da classe IgM e IgG e são potentes ativadores das proteínas do sistema complemento, provocando hemólise intravascular imediata e podendo levar o paciente a óbito. A incompatibilidade ABO materno-fetal raramente desencadeia uma DHFN grave, apresentando um caráter benigno na maioria das vezes.

O sistema ABO é considerado um sistema de histocompatibilidade, por estar presente maioria das células epiteliais, células endoteliais, linfócitos e plaquetas e se apresentar na forma solúvel em secreções como saliva e todos os fluidos corporais (exceto líquido cefalorraquidiano).

ANTÍGENOS ABO

Os antígenos ABO são sintetizados na membrana eritrocitária pela adição de carboidratos a uma cadeia precursora glicoproteica ou glicolipídica. O gene *ABO* está localizado no cromossomo 9q34 e codifica enzimas glicosiltransferases que adicionam moléculas de carboidratos na cadeia precursora. O gene *A* codifica a enzima N-acetilgalactosaminiltransferase, que adiciona uma molécula de N-acetilgalactosamina, e o gene *B* codifica a enzima D-galactosiltransferase, que adiciona uma molécula de D-galactose. A **Figura 14.1** mostra a estrutura bioquímica dos antígenos H, A e B. A expressão dos antígenos A e B é regulada pelo



**FIGURA 14.1** Estrutura bioquímica dos antígenos H, A e B.

FUC, fucose; GALNAC, N-acetil-galactosamina; GAL, D-galactose.

gene *H* (*FUT1*). O gene *H* codifica a enzima L-fucosil-transferase, responsável pela síntese da molécula de L-fucose (antígeno H), que é adicionada à cadeia precursora. Indivíduos do grupo O expressam uma enzima não funcional e apresentam o antígeno H intacto. Na ausência do antígeno H, os antígenos A e B não são expressos na membrana eritrocitária. Raros indivíduos que têm o gene *hh* não expressam o antígeno H e são conhecidos como fenótipo Bombay.

Os antígenos A, B e H podem ser expressos também na saliva, na forma de glicoproteínas, em indivíduos que apresentam o gene secretor *Se*. A pesquisa na saliva auxilia a classificação dos subgrupos ABO.

O sistema ABO apresenta quatro fenótipos principais A, B, AB e O. A **Tabela 14.2** mostra os principais fenótipos ABO. Os subgrupos ABO são fenótipos que diferem na quantidade de antígenos A e B expressa na membrana eritrocitária. Os subgrupos de A são os mais frequentes, e os subgrupos de B são muito raros. A maioria dos indivíduos do grupo A é do subgrupo A<sub>1</sub> (80%) e 20% é do subgrupo A<sub>2</sub> ou subgrupos mais fracos. Indivíduos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> diferem qualitativa e quantitativamente na expressão do antígeno A, com uma reatividade de 4+ com anti-A, não apresentando problemas na sua identificação sorológica.

A expressão dos antígenos ABO é máxima entre 2 e 4 anos de vida, sendo recomendada a repetição posterior de uma tipagem ABO duvidosa em recém-nascidos.

SUBGRUPOS ABO FRACOS

Os subgrupos ABO fracos (A<sub>3</sub>, A<sub>x</sub>, A<sub>m</sub>, A<sub>el</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>x</sub>, B<sub>m</sub>) apresentam reações sorológicas com menor reatividade (0 a 2+), podendo não ser detectados com anti-A ou anti-B. Assim, é de fundamental importância a pesquisa de anticorpos ABO no



TABELA 14.2 Fenótipos ABO			
FENÓTIPO	GENÓTIPO	ANTÍGENOS (ERITRÓCITOS)	ANTICORPOS (SORO/ PLASMA)
A <sub>1</sub>	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> , A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> , A <sup>1</sup> O	A <sub>1</sub>	Anti-B
A <sub>2</sub>	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> , A <sup>2</sup> O	A <sub>2</sub>	Anti-B, anti-A1 (1-8% dos casos)
B	BB, BO	B	Anti-A
A <sub>1</sub> B	A <sup>1</sup> B	A <sub>1</sub> B	Ausentes
A <sub>2</sub> B	A <sup>2</sup> B	A <sub>2</sub> B	Ausentes, anti-A1 (22-35% dos casos)
O	OO	H	Anti-A, -B, -AB

Fonte: Adaptada de Girello e Kühn<sup>1</sup> e Harmening.<sup>3</sup>

soro ou plasma (prova reversa) para detectar a presença de um fenótipo A fraco. O subgrupo A<sub>3</sub> apresenta uma reatividade 2+ com anti-A e dupla população com células aglutinadas e células não aglutinadas (campo misto). O campo misto observado nesse subgrupo ocorre devido à presença de eritrócitos com mais de 2 mil sítios do antígeno A (aglutinam) e eritrócitos com menos de 2 mil sítios do antígeno A (não aglutinam).

As lectinas anti-A1 (*Dolichos biflorus*) e anti-H (*Ulex europaeus*) podem ser utilizadas para diferenciar subgrupos ABO. A lectina anti-A1 aglutina eritrócitos A1 e não aglutina outros fenótipos de A. Essa reação é explicada porque a enzima A<sub>2</sub> não consegue ligar carboidratos na cadeia ramifi-

cada e sim nas cadeias lineares, sintetizando um antígeno qualitativamente diferente do A1. Essa diferença antigênica também é demonstrada pela formação de anticorpos naturais anti-A1 em 1 a 8% dos indivíduos A<sub>2</sub> e 22 a 35% dos indivíduos A<sub>2</sub>B.

A lectina anti-H aglutina eritrócitos com antígeno H não convertido em antígeno A. Os fenótipos A fracos apresentam glicosiltransferases com menor atividade, e o eritrócito permanece com um número maior de sítios H. Assim, a reatividade com anti-H é negativa com eritrócitos A<sub>1</sub> e aumenta gradativamente com os fenótipos A fracos. No laboratório, os subgrupos A fracos podem ser classificados de acordo com a intensidade de aglutinação com os antissoros anti-A e anti-A,B, a lectina anti-A1, a presença de anti-A1, a presença dos antígenos A e H na saliva, os testes de adsorção-eluição, a genotipagem eritrocitária ABO e os estudos familiares. A **Tabela 14.3** mostra a reatividade observada em subgrupos de A e B.

**ANTICORPOS ABO**

Os anticorpos ABO estão ausentes ao nascimento e são produzidos entre 3 e 6 meses de vida. São anticorpos naturais, pois sua formação não necessita de aloimunização por transfusão sanguínea ou gestação. Os anticorpos ABO também são regulares, pois estão presentes na maioria dos indivíduos e podem estar ausentes em situações específicas como em idosos e imunossuprimidos, além de recém-nascidos. A hipótese mais aceita é que os anticorpos ABO são produzidos contra carboidratos de bactérias presentes na microbiota intes-

TABELA 14.3 Reatividade observada em subgrupos de A e B									
FENÓTIPO	ANTISSOROS			LECTINA ANTI-A1	LECTINA ANTI-H	ERITRÓCITOS			SALIVA (SECRETORES)
	ANTI-A	ANTI-B	ANTI-A,B			A1	B	O	
A <sub>1</sub>	4+	0	4+	3+/4+	0	0	4+	0	A, H
A <sub>2</sub>	4+	0	4+	0	2+	0/2+*	4+	0	A, H
A <sub>3</sub>	2+ cm	0	2+ cm	0	3+	0/2+*	4+	0	A, H
A <sub>x</sub>	0/±	0	1-2+	0	4+	0/2+	4+	0	H
A <sub>el</sub>	0	0	0	0	4+	0/2+	4+	0	H
B	0	4+	4+	0	0	4+	0	0	B, H
B <sub>3</sub>	0	1+cm	2+cm	0	4+	4+	0	0	B, H
B <sub>x</sub>	0	0/±	0/2+	0	4+	0	0	0	B, H

\*A ocorrência de anti-A1 nesses fenótipos é variável. 0, ausência de aglutinação; 1+ a 4+, intensidade da hemaglutinação; ±, aglutinação fraca; cm, campo misto (ver Graduação da reação de aglutinação e escore numérico).

Fonte: American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



tinal que mimetizam os antígenos ABO. Os anticorpos são produzidos contra o antígeno que está ausente no indivíduo. Por exemplo: indivíduo do grupo A produz anticorpos anti-B, indivíduo do grupo B produz anticorpos anti-A, indivíduo do grupo O produz anti-A e anti-B e indivíduo do grupo AB não produz anticorpos ABO; ver a **Tabela 14.2**. Anticorpos da classe IgM são predominantes em indivíduos dos grupos A e B e, em indivíduos do grupo O, predomina o isotipo IgG. A DHFN é mais comum em gestantes do grupo O, que apresentam IgG anti-A e anti-B em maior título. Indivíduos do grupo O também sintetizam um anticorpo anti-A,B, que reconhece um epítipo comum dos antígenos A e B.

## TIPAGEM SANGUÍNEA ABO

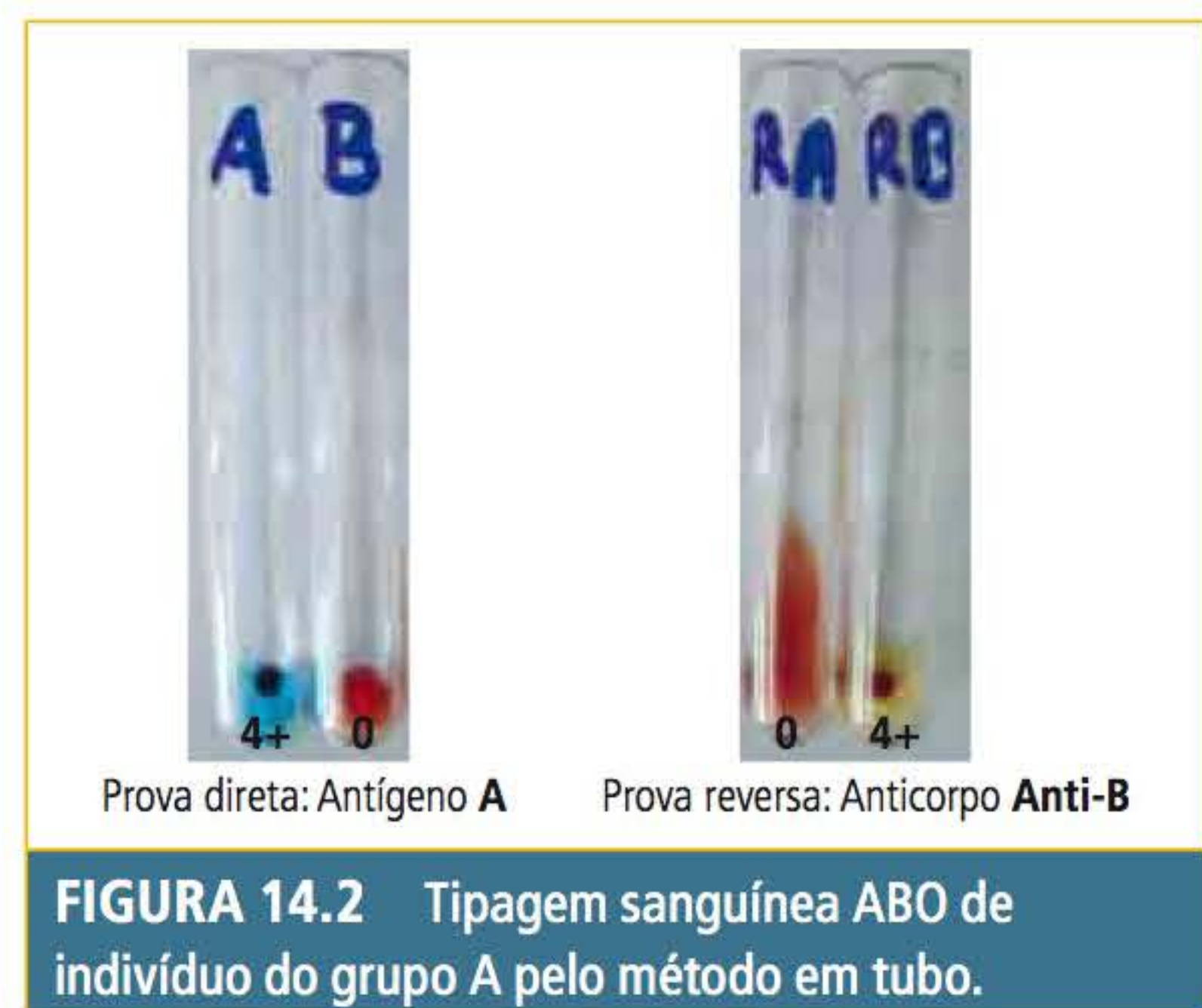
É imprescindível que a tipagem sanguínea ABO seja realizada utilizando a prova direta, que pesquisa os antígenos A e B, e a prova reversa, que detecta anticorpos ABO (ver Métodos laboratoriais, método 1 [Quadro 14.2]).

A prova direta é realizada testando-se eritrócitos do paciente com anticorpos monoclonais específicos anti-A e anti-B. O antissoro anti-AB é opcional quando a tipagem sanguínea é realizada com anticorpos monoclonais. A prova reversa pesquisa anticorpos anti-A e anti-B no soro ou plasma do paciente testado com hemácias reagentes fenotipados A<sub>1</sub> e B. A prova reversa sempre deve ser realizada, exceto em crianças com idade inferior a 4 meses e para confirmar a tipagem sanguínea de doadores de sangue já fenotipados. A técnica de tipagem sanguínea ABO está descrita no item Métodos laboratoriais, método 1 (Quadro 14.2). A **Figura 14.2** demonstra o resultado de uma tipagem sanguínea de indivíduo do grupo A, realizada pelo método em tubo.

## DISCREPÂNCIAS ABO

As provas direta e reversa são complementares e resultados discrepantes devem ser esclarecidos antes da liberação dos resultados. As discrepâncias ABO podem ocorrer por alterações nos antígenos, no soro/plasma ou devido a erros laboratoriais.

Em caso de uma discrepância ABO, erros laboratoriais sempre devem ser investigados. Os erros laboratoriais podem ocorrer devido à troca de amostras, suspensão de eritrócitos com concentração que não corresponde ao preconizado (2-5%), não adição de reagentes, procedimento diferente do preconizado pelo fabricante, centrifugação incor-



**FIGURA 14.2** Tipagem sanguínea ABO de indivíduo do grupo A pelo método em tubo.

**Nota:** O antissoro anti-AB é opcional quando a tipagem sanguínea é realizada com anticorpos monoclonais.

A, anti-A; B, anti-B; AB, anti-AB; RA1, hemácias reagentes A<sub>1</sub>; RB, hemácias reagentes B; 0, ausência de aglutinação; 4+, aglutinação com formação de um aglutinado sólido (ver Graduação da reação de aglutinação e escore numérico).

reta e interpretação e transcrição incorretas. A primeira providência é repetir a fenotipagem ABO. A repetição pode ser realizada utilizando-se eritrócitos lavados com solução salina e reagentes novos e, se ainda assim o resultado entre a prova direta e reversa permanecer discrepante, testes adicionais devem ser realizados.

A **Figura 14.3** mostra um exemplo de discrepância ABO na prova direta pela presença do fenótipo fraco A<sub>x</sub>B. A tipagem sanguínea foi realizada pelo método de gel-teste (BIO-RAD®). A prova direta apresentou um resultado B e, na prova reversa, não é observada a presença esperada de anticorpos anti-A, demonstrando ser um indivíduo do grupo AB. Se a prova reversa não fosse realizada, o resultado dessa tipagem sanguínea seria incorretamente liberado como B. Essa discrepância poderia ser também decorrente de uma amostra de paciente com hipogamaglobulinemia com prova reversa discrepante (p. ex.: tipagem sanguínea B com ausência de anti-A).

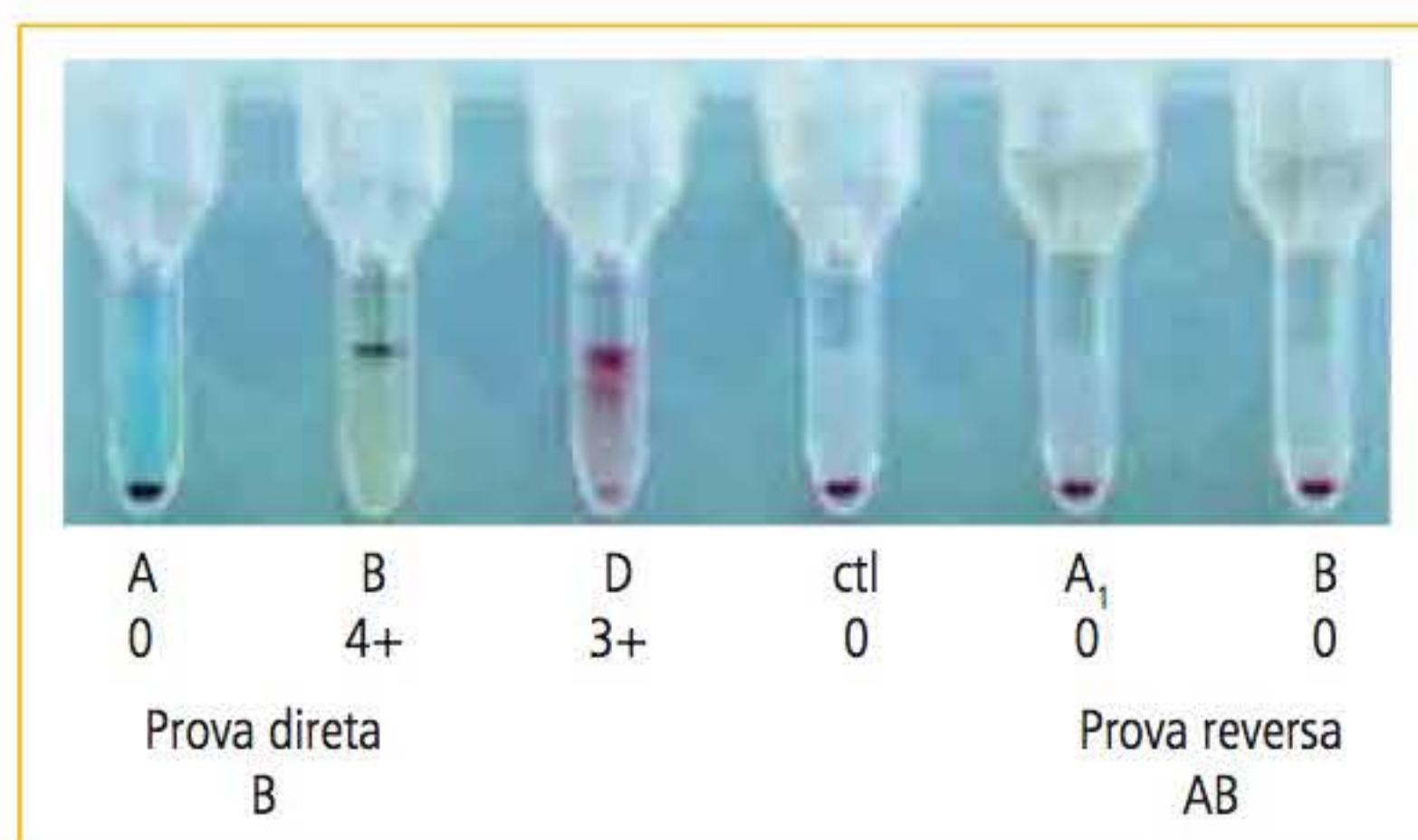
## RESOLVENDO DISCREPÂNCIAS ABO

Se erros laboratoriais forem excluídos com a repetição do ensaio e houver permanência da discrepância, as possibilidades a seguir devem ser consideradas e investigadas.

### Ausência ou diminuição de antígenos

A diminuição ou perda de reatividade dos antissoros com os antígenos pode ser explicada pela presença de subgrupos ABO fracos, transfusão sanguínea, transplantes ou processos patológicos,





**FIGURA 14.3** Discrepância ABO na prova direta por subgrupo AxB\*.

**Notas:** \*Subgrupo confirmado com lectinas anti-A1 e anti-H e adsorção-eluição. Método gel-teste BIO-RAD®.

A, anti-A; B, anti-B; D, anti-D; ctl, controle; A<sub>1</sub>, eritrócitos A<sub>1</sub>; B, eritrócitos B; 0, ausência de aglutinação; 3+/4+, intensidade da aglutinação (ver Metodologias utilizadas na imuno-hematologia eritrocitária).

como leucemia. Reações fracas ou negativas discrepantes podem ser repetidas com incubação por 30 minutos em temperatura ambiente e, se necessário, mais 30 minutos a 4 °C (ver Métodos laboratoriais, método 6 [Quadro 14.7]), utilizando sempre um controle negativo da reação (p. ex.: soro/plasma do paciente e eritrócitos do grupo O). Para comprovar a presença dos antígenos ABO, pode ser realizada a pesquisa dos antígenos A, B e H na saliva (para indivíduo secretor) ou a genotipagem do *locus* ABO.

### Reações inesperadas com antissoros (prova direta)

#### Formação de *rouleaux*

A formação de *rouleaux* é a causa mais comum de discrepância de tipagem sanguínea. O *rouleaux* ocorre devido à alteração na proporção das concentrações de albumina/globulina em situações patológicas como mieloma múltiplo, crioglobulinemia, cirrose e hiperfibrinogenemia causada por infecções. Os eritrócitos aparecem ao microscópio óptico empilhados como moedas. A técnica de substituição do soro/plasma por salina pode ser usada para diferenciar *rouleaux* de aglutinação específica (ver Métodos laboratoriais, método 8 [Quadro 14.9]).

#### Fenótipo B adquirido

O fenótipo B adquirido é observado em pacientes com quadro de bacteremia como obstrução gastrointestinal ou malignidade intestinal. O antígeno A é modificado por deacetilação enzimática e convertido em antígeno B-like, provocando uma

aglutinação geralmente fraca (2+ ou menos) com anti-B clone ES-4. Nesse caso, o paciente aparenta ter uma tipagem sanguínea AB, e a discrepância pode ser detectada pela prova reversa, que indica um resultado A (presença de anti-B). Para confirmar esse resultado, pode ser realizada a tipagem com clone diferente de anti-B, a pesquisa dos antígenos A e B na saliva (para paciente secretor) ou a genotipagem eritrocitária.

#### Poliaglutinação

A poliaglutinação é caracterizada pela aglutinação dos eritrócitos com todos antissoros e pode ser ocasionada por um processo infeccioso ou herança genética. Um exemplo é a ativação do antígeno T que ocorre pela clivagem do ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico) por enzimas bacterianas ou virais, expondo criptoantígenos nos eritrócitos.

#### Fenótipos B(A) e A(B)

O fenótipo B(A) é caracterizado pela expressão fraca do antígeno A em eritrócitos do grupo B. Os eritrócitos de indivíduos B(A) reagem fortemente com anti-B e apresentam reação fraca (< 2+) com antissoro monoclonal anti-A (geralmente clone MHO4), e a prova reversa tem uma forte reatividade com eritrócitos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. Essa discrepância pode ser esclarecida com a utilização de anti-A policlonal ou com clone diferente do MHO4. O fenótipo A(B) tem sido identificado com anti-B monoclonal e foi associado com concentrações plasmáticas elevadas do antígeno H e atividade plasmática da transferase H.

#### Eritrócitos sensibilizados com anticorpos IgG

Os eritrócitos sensibilizados por IgG (teste de Coombs direto positivo) podem aglutinar espontaneamente com antissoros com alta concentração proteica. A tipagem ABO pode ser repetida após a dissociação de IgG pela técnica da cloroquina seguida da técnica de bloqueio (ver Métodos laboratoriais, métodos 9 e 10 [Quadro 14.10 e 14.11]).

#### Eritrócitos sensibilizados com anticorpos IgM

Os eritrócitos de pacientes com crioaglutininas IgM podem aglutinar espontaneamente. Em caso de suspeita de presença de crioaglutininas, o teste pode ser repetido após a lavagem dos eritrócitos com solução salina aquecida a 37 °C ou usando a técnica pré-aquecida (ver Métodos laboratoriais, método 4 [Quadro 14.5]). A tipagem sanguínea



pode ser realizada também com eritrócitos previamente tratados com ditioneitol (DTT) que destrói IgM.

### Sangue de cordão umbilical

O sangue de cordão umbilical contém a geleia de Wharton, que pode causar hemaglutinação inespecífica. A fenotipagem de sangue de cordão umbilical deve ser realizada após 6 a 8 lavagens com solução salina (NaCl 0,9%) para evitar resultado falso-positivo.

### Reações inesperadas com eritrócitos A<sub>1</sub> e B (prova reversa)

#### Diminuição ou perda de reatividade do soro/plasma do paciente

A diminuição ou perda da reatividade do soro/plasma do paciente está relacionada com a idade (< 4 meses de vida ou idosos), hipogamaglobulinemia ou transplantes. Reações fracas ou negativas discrepantes podem ser repetidas com incubação por 30 minutos em temperatura ambiente e, se necessário, mais 30 minutos a 4 °C (ver Métodos laboratoriais, método 6 [Quadro 14.7]), utilizando sempre um controle negativo da reação (p. ex.: soro/plasma do paciente e eritrócitos do grupo O).

### Aglutinações inespecíficas

Aglutinações inespecíficas podem ser observadas pela presença de autoanticorpos frios (p. ex., anti-I), aloanticorpos frios (p. ex., antim), anti-A1 em indivíduos A<sub>2</sub>, em pacientes transplantados, após transfusão de hemocomponentes contendo plasma e formação de *rouleaux*.

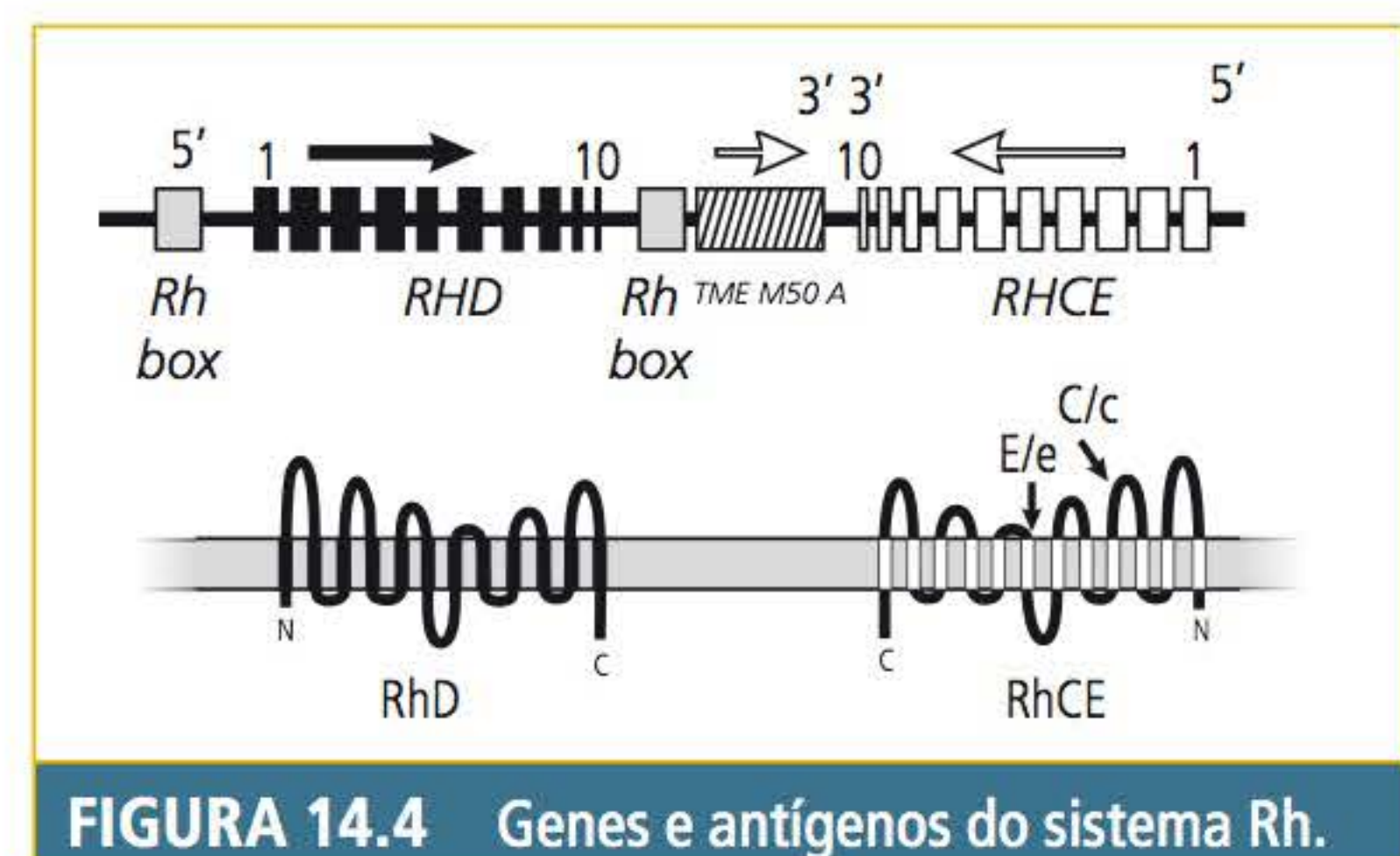
A presença de anti-A1 pode ser confirmada pela realização da prova reversa com eritrócitos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e O, e a confirmação de subgrupo, com lectinas anti-A1 e anti-H. Aloanticorpos frios podem ser confirmados pela identificação de anticorpos irregulares com painel de hemácias fenotipadas. A técnica de substituição do soro/plasma com salina pode ser usada para diferenciar *rouleaux* de aglutinação específica (ver Métodos laboratoriais, método 8 [Quadro 14.9]).

## SISTEMA Rh

O sistema Rh é o segundo mais importante na medicina transfusional. Anticorpos específicos contra antígenos Rh (ex. anti-D, anti-c) podem causar reação hemolítica pós-transfusional e DHFN grave. O sistema Rh é o maior e mais complexo dos sistemas de grupos sanguíneos.

## ANTÍGENOS Rh

Foram identificados pelo menos 50 antígenos Rh, e os cinco principais são o D, C, c, E, e. Os antígenos Rh são codificados por um par de genes homólogos *RHD* e *RHCE*, localizados no cromossomo 1p36.11, com 10 éxons cada. Os genes *RHD* e *RHCE* estão localizados muito próximos um do outro e orientados em direções opostas. O gene *RHD* codifica a proteína D, e o gene *RHCE* codifica as proteínas C, c, E, e. As proteínas RhD e RhCE têm 417 aminoácidos, diferem entre si em 31 e 35 aminoácidos e são moléculas hidrofóbicas que atravessam a membrana eritrocitária 12 vezes, com seis *loops* externos. A Figura 14.4 mostra os genes e antígenos do sistema Rh.



**FIGURA 14.4** Genes e antígenos do sistema Rh.

Fonte: Adaptada de Daniels.<sup>4</sup>

A maioria dos indivíduos RhD negativos apresentam deleção completa do gene *RHD*. O antígeno D é altamente imunogênico e clinicamente o mais importante do sistema Rh. A exposição de um indivíduo RhD negativo ao antígeno D com frequência induz a formação de anticorpos (aloimunização) anti-D. A transfusão de sangue RhD incompatível (200 mL ou mais) é responsável pela aloimunização de 85% dos indivíduos RhD negativos. Entretanto, a exposição a pequenos volumes (0,5-1 mL) de sangue incompatível pode induzir uma resposta imune humoral para produção do anti-D.

## ANTÍGENOS D VARIANTES

O antígeno D possui 30 epítomos identificados por anticorpos monoclonais. A substituição de um único aminoácido na proteína Rh pode afetar a expressão de epítomos ou expressar epítomos novos. Os antígenos D variantes se originam de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) ou de algumas alterações de nucleotídeos, resultando



em substituições de aminoácidos na proteína RhD e conversão gênica entre os genes *RHD* e *RHCE*, originando um gene híbrido com substituição de parte do gene *RHD* por uma sequência correspondente do gene *RHCE*.

Os testes moleculares demonstraram uma plethora de alelos *RHD* classificada em D fraco, D parcial e DEL.

### D fraco

O termo D<sup>u</sup> foi substituído pelo termo D fraco. A variante D fraco ocorre devido a substituições de aminoácidos na região intracelular ou transmembranária da proteína D. A **Figura 14.5** ilustra as substituições de aminoácidos na membrana eritrocitária nas variantes D fraco e D parcial. Os epítomos estão preservados, e a alteração é quantitativa, com diminuição do número de sítios do antígeno D na membrana eritrocitária, variando de 60 a 3.800 sítios de D/eritrócito. A prevalência do D fraco varia de 0,2 a 1% em brancos; a maioria (> 90%) é D fraco tipo 1 (DF1), DF2 e DF3 e não produz anti-D. Entretanto, pacientes com os fenótipos D fraco tipo 4.0, 4.2, 11, 15, 21 e 57 foram associados com a produção de aloanti-D.

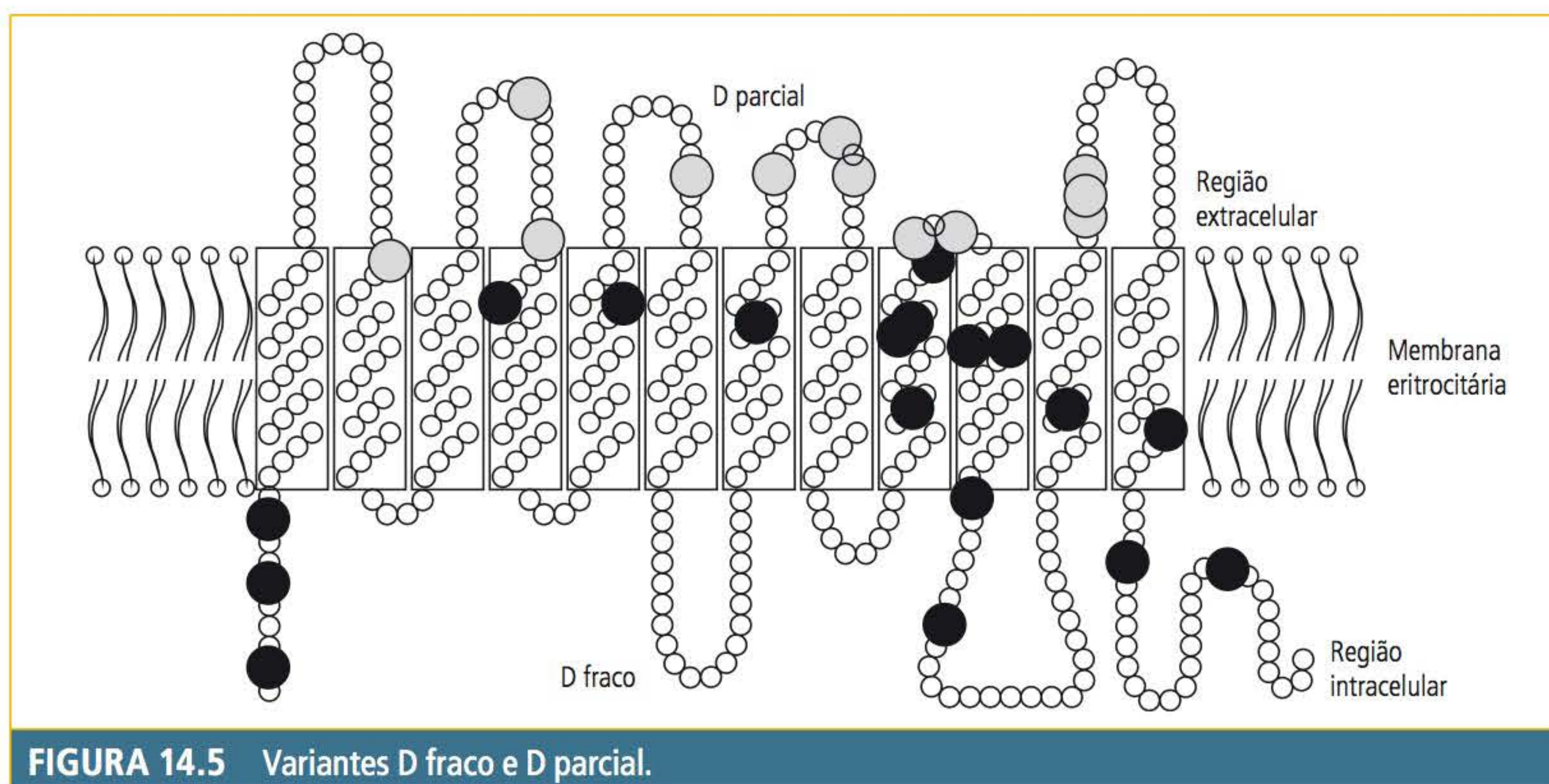
### D parcial

Indivíduos D parcial perdem um ou mais epítomos da proteína D e, quando expostos ao antígeno D normal, podem produzir anti-D contra a parte da

proteína D ausente. A substituição de aminoácidos ocorre na região extracelular da proteína D. A **Figura 14.5** mostra as substituições de aminoácidos nas variantes D fraco e D parcial. A alteração no D parcial sempre é qualitativa, ocasionada pela perda (ou ganho) de epítomos da proteína D. Além da alteração qualitativa, o D parcial também pode possuir alteração quantitativa, com redução do número de sítios do antígeno D na membrana eritrocitária.

A variante D parcial é classificada em categorias (DII a DVII) e por nomes como DBT, DFR e DHAR. A reatividade do D parcial com anti-D pode variar apresentando uma reação mais fraca (DVI), similar (DIII) ou mais forte (DIV) em relação ao antígeno D normal. A diferença de reatividade está relacionada com o número de sítios do antígeno D/eritrócito, variando de 13.000-24.000 no D normal, de 3.000 no DVI tipo 2 e 33.000 no DIII tipo 4.

A variante DVI tem alteração quantitativa, com reatividade na fase de antiglobulina humana (AGH) como o D fraco e alteração qualitativa com a perda dos epítomos 1, 2, 4, 5, 6 e 8. A **Figura 14.6** compara as variantes D fraco e D parcial com o D normal. Estudos moleculares demonstraram que indivíduos DVI têm um gene híbrido com substituição dos éxons 3, 4, 5 e 6 do gene *RHD* por éxons do gene *RHCE*. A **Figura 14.7** mostra um diagrama dos genes *RHD* parcial DVI.

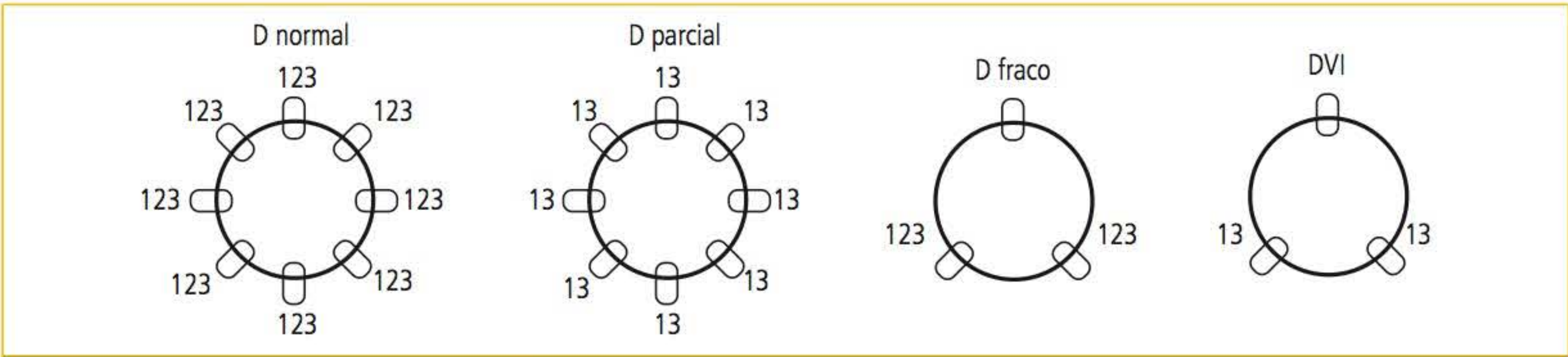


**FIGURA 14.5** Variantes D fraco e D parcial.

D fraco, substituição de aminoácidos na região intracelular e transmembranária da proteína D (em preto); D parcial, substituição de aminoácidos na região extracelular da proteína D (em cinza).

**Fonte:** Adaptada de Flegel e Wagner.<sup>5</sup>

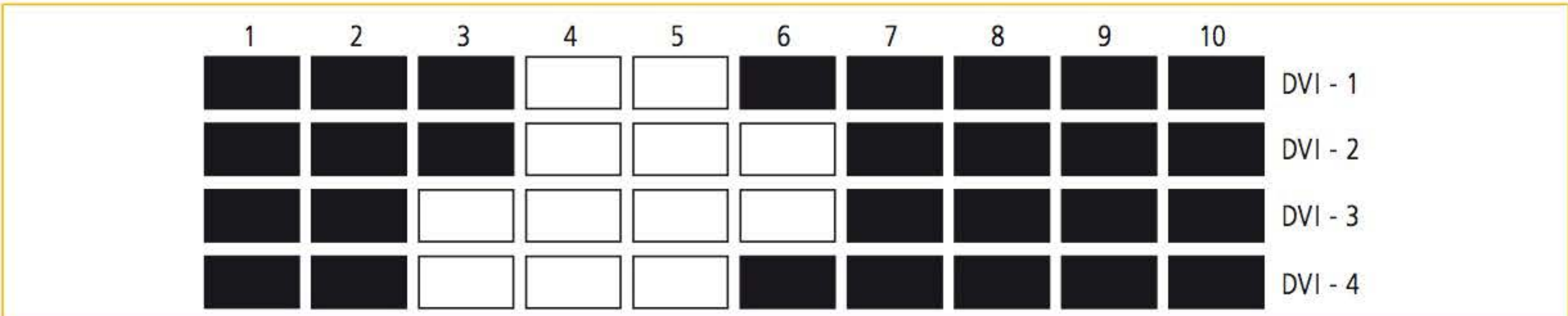




**FIGURA 14.6** Comparação do D fraco e D parcial com o D normal.

**Nota:** Círculos representam a membrana eritrocitária. Números 123 representam arbitrariamente três epítomos da proteína D. D normal apresenta todos os epítomos sem alteração quantitativa; D fraco apresenta todos os epítomos com diminuição dos sítios de D (alteração quantitativa); D parcial, alteração qualitativa com perda de epítomo, mas com número de sítios RhD inalterados; DVI, D parcial com diminuição dos sítios de D (alteração qualitativa e quantitativa).

**Fonte:** Adaptada de Flegel e colaboradores.<sup>6</sup>



**FIGURA 14.7** Diagrama dos genes RHD parcial DVI. Éxons do gene RHD em preto; éxons do gene RHCE em branco.

**Fonte:** Adaptada de Daniels.<sup>4</sup>

**DEL**

Os eritrócitos DEL expressam uma quantidade extremamente diminuída de sítios da proteína D ( $\leq 36$  sítios de D/célula) e não são detectados pela tipagem sanguínea convencional. O DEL só pode ser demonstrado por meio de técnicas de adsorção-eluição ou genotipagem *RHD*. A variante DEL é observada em 10 a 30% dos indivíduos asiáticos classificados sorologicamente como RhD negativo. A transfusão sanguínea de eritrócitos de doadores DEL pode induzir a produção de anti-D em pacientes RhD negativo.

**❖ FENOTIPAGEM RhD, QUAL REAGENTE ESCOLHER?**

Os primeiros reagentes anti-D utilizados na rotina eram policlonais de origem humana. A tecnologia dos anticorpos monoclonais associada com a escassez de anticorpos policlonais humanos incentivou a substituição dos anti-D policlonais por anti-D monoclonais. Por essa razão, na maioria dos laboratórios, a fenotipagem RhD é realizada com anti-D monoclonais (mAb).

Na prática laboratorial, a classificação sorológica do D normal, D fraco e D parcial não é simples.

A escolha do reagente anti-D deve ser criteriosa. Estão disponíveis vários clones de anti-D monoclonais que podem ser da classe IgG ou IgM ou uma mistura dos dois (*blend*). O anticorpo anti-D IgM reage à temperatura ambiente, e o anti-D IgG reage até a fase da antiglobulina humana (AGH, soro de Coombs) para a pesquisa do D fraco.

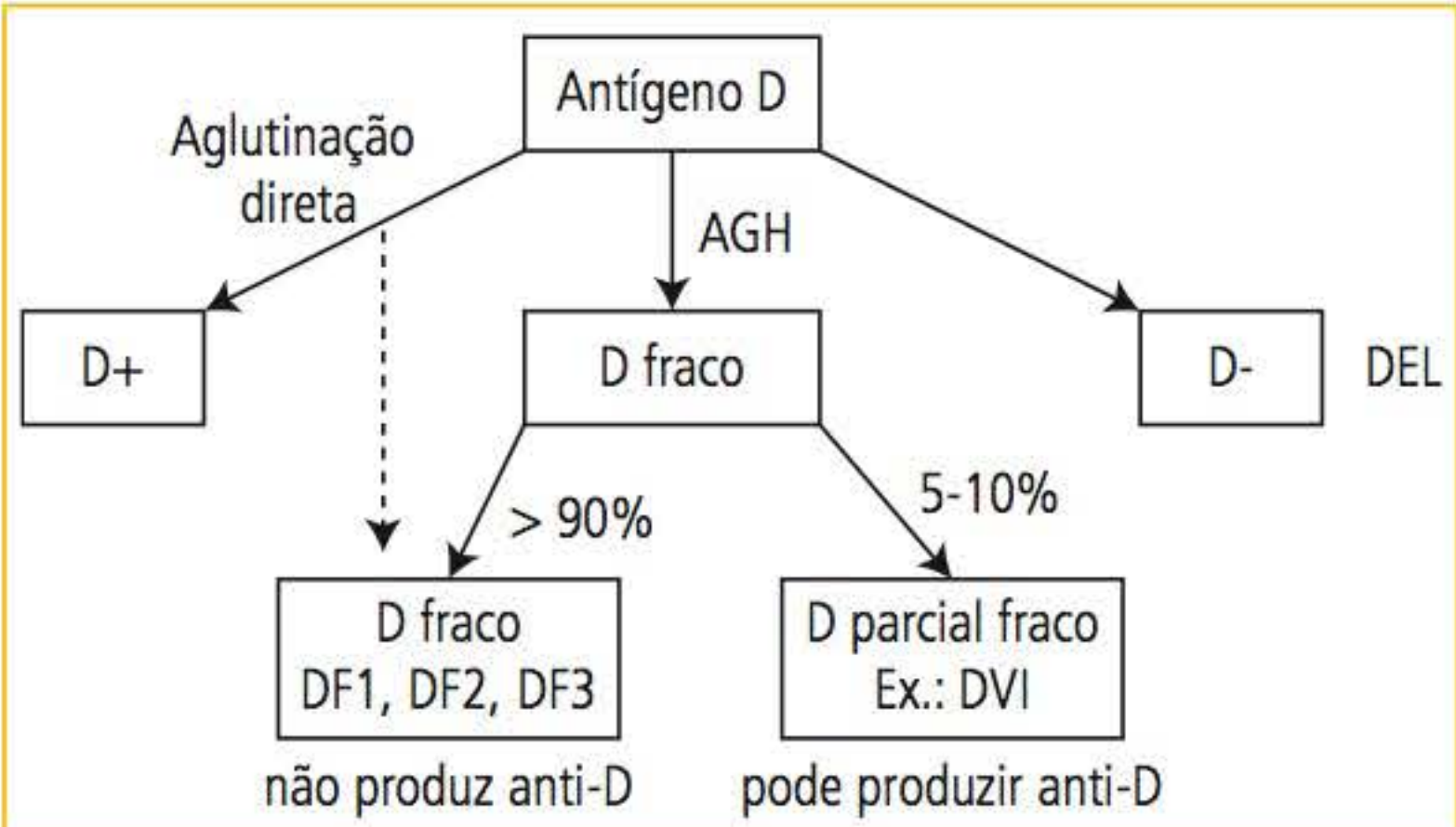
Os anticorpos anti-D mAb reconhecem epítomos da proteína D e, dependendo do clone utilizado, podem não ser detectadas D variantes. A variante DVI é a mais comumente associada com a produção de aloanti-D; assim, alguns autores não recomendam utilizar antissoros que detectam DVI (DVI+) para realizar a fenotipagem dos pacientes (receptores de sangue e gestantes). Pacientes DVI devem ser considerados RhD negativos para fins de transfusão sanguínea e imunoprofilaxia Rh. No Reino Unido, é recomendada a fenotipagem de pacientes com dois anti-D IgM mAb potentes, que não detectam DVI (DVI-) e que não seja realizada a fase da antiglobulina.

Em doadores de sangue, devem ser utilizados antissoros que detectam a maioria dos D variantes, e o teste deve ser realizado até a fase da antiglobulina. Todos os D variantes devem ser considerados



D+. Tanto em doadores como em receptores de sangue, recomenda-se a utilização de dois reagentes anti-D, um que detecta DVI (DVI+) e outro que não detecta DVI (DVI-). Em receptores, se houver discrepância entre os dois antissoros, deve-se investigar a presença de D fraco e D parcial.

Sorologicamente, um indivíduo pode ser classificado como RhD positivo (aglutinação direta), RhD negativo (ausência de aglutinação) e RhD fraco. A denominação D fraco é utilizada quando os eritrócitos não aglutinam com anti-D na centrifugação imediata (aglutinação direta), mas aglutinam após a adição da antiglobulina humana. O D fraco varia entre 0,1 a 2%, dependendo da população analisada. Mais de 90% dos indivíduos D fraco (DF) são DF1, DF2 e DF3, que não produzem anti-D. Entretanto, cerca de 5 a 10% dos fenótipos classificados sorologicamente como D fraco (aglutinação < 2+) são D parcial fraco, por exemplo, o DVI, e podem produzir aloanticorpo anti-D. Por esse motivo, alguns autores recomendam que gestantes e receptores de sangue classificados como D fraco com anti-D (DVI+) mAb IgG ou *blend* (IgM+IgG) sejam considerados RhD negativo para fins de transfusão sanguínea e imunoprofilaxia Rh. Os fenótipos DEL e D fraco com baixa densidade antigênica podem ser classificados erroneamente como RhD negativos devido à sensibilidade dos testes sorológicos na fase de AGH (150-500 moléculas de IgG/eritrócito). A **Figura 14.8** mostra o resultado esperado dos testes sorológicos para o antígeno D e variantes D fraco e D parcial.



**FIGURA 14.8** Testes sorológicos para o antígeno D e variantes D fraco e D parcial.

**Notas:** Os eritrócitos que aglutinam com anti-D na fase de AGH são classificados como D fraco (DF). DF1 e DF2 podem ser detectados na aglutinação direta com anti-D mAb. Fenótipos DEL e D fraco com baixa densidade antigênica podem ser classificados erroneamente como D-.  
D+, RhD positivo; D-, RhD negativo; AGH, antiglobulina humana (soro de Coombs).

Na seleção do antissoro anti-D monoclonal para a rotina laboratorial, deve ser considerado qual o epítipo será detectado pelo clone do antissoro. Dependendo do clone de anti-D utilizado, um paciente DVI pode ser classificado sorologicamente como D positivo (clone ESD-1M), D fraco (clone MS-26) ou D negativo (clone MS-201). Se o paciente for uma gestante ou um receptor de sangue, recomenda-se utilizar o clone MS-201 na rotina laboratorial. Por outro lado, se for um doador de sangue, os clones MS-26 e/ou ESD-1M devem ser utilizados pelo banco de sangue. A **Tabela 14.4** mostra os principais clones de anti-D monoclonais utilizados na rotina laboratorial.

TABELA 14.4 Anti-D monoclonais utilizados na rotina laboratorial			
CLONE	CLASSE DO ANTICORPO	EPÍTOPO DETECTADO	DETECÇÃO DE DVI
ESD-1M	IgM	9	+ (aglutinação direta)
RUM1	IgM	6/7	-
TH28	IgM	6/7	-
MS-201	IgM	6/7	-
MS-26	IgG	3/9	+ (fase de AGH)
ESD-1	IgG	9	+ (fase de AGH)
LDM-1	IgM	6/7	- (pode detectar DHAR)

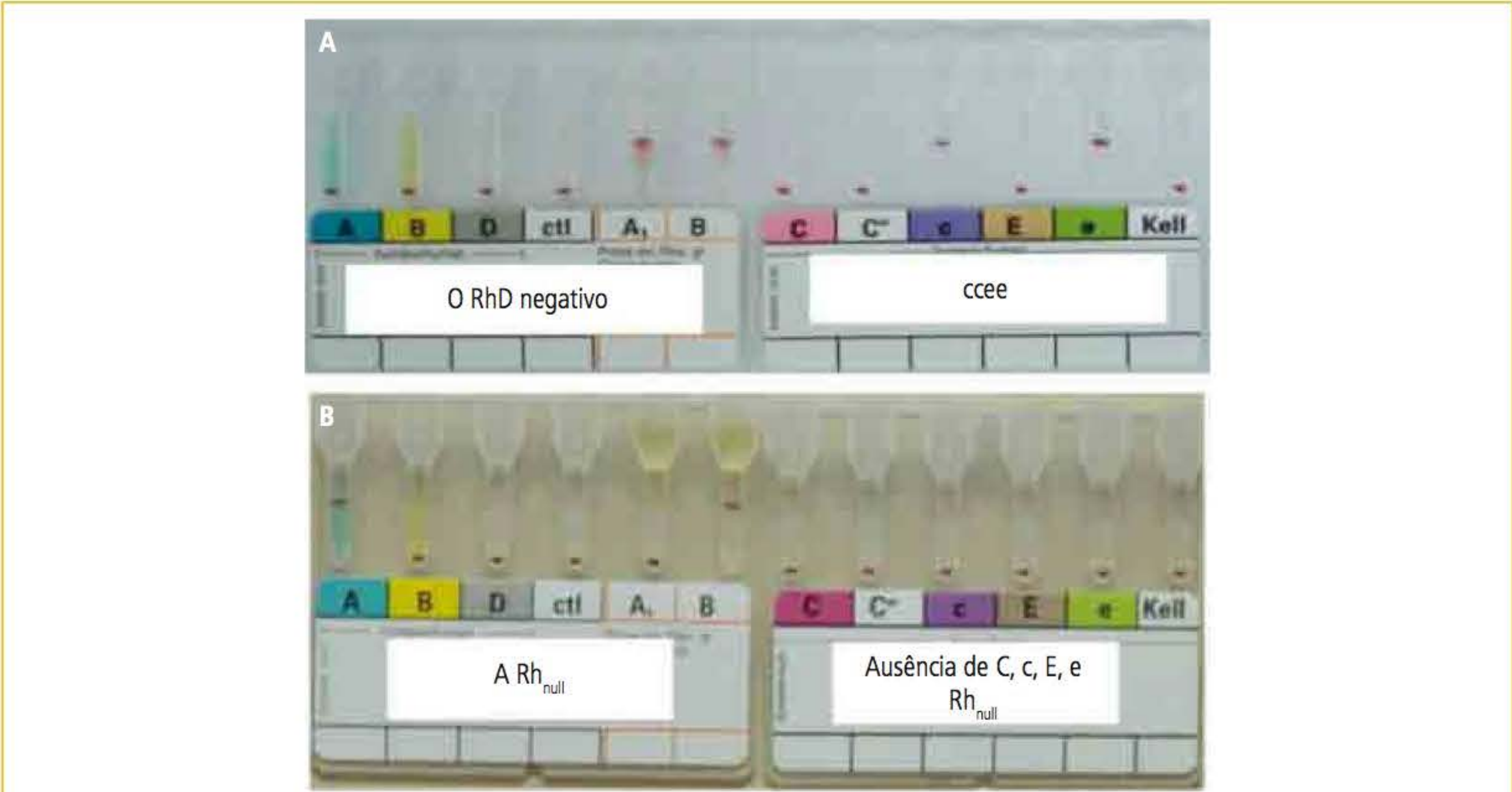
Fonte: Bromilow.<sup>7</sup>

**Rh<sub>null</sub>**

As proteínas do sistema Rh formam um complexo na membrana eritrocitária. A expressão das proteínas RhD/RhCE está associada com a expressão da proteína RhAG, codificada pelo gene *RHAG*, que está localizado no cromossomo 6. Outras proteínas também fazem parte do complexo Rh, como CD47, LW(ICAM-4), glicoforina B e banda 3.

A ausência de antígenos Rh na membrana eritrocitária é conhecida como Rh<sub>null</sub>. Indivíduos Rh<sub>null</sub> apresentam esferócitos e estomatócios e diferentes graus de anemia. O Rh<sub>null</sub> é classificado em dois tipos, o *regulador* e o *amorfo*. O Rh<sub>null</sub> tipo *regulador* é causado por mutações no gene *RHAG*, e as proteínas Rh ou RhAG não são expressas na membrana eritrocitária. O Rh<sub>null</sub> tipo *amorfo* é causado por mutações no gene *RHCE* com deleção do gene *RHD*. Indivíduos Rh<sub>null</sub> tipo





**FIGURA 14.9** Fenotipagem Rh pelo método de gel-teste de um indivíduo: (A) Fenótipo RhD negativo com expressão dos antígenos 'c' e 'e' (ccddee)\*; (B) Fenótipo Rhnull.\*\*

**Notas:** \*Não há expressão do antígeno D; estão expressos os antígenos 'c' e 'e'.  
\*\* Não há expressão dos antígenos Rh (D, C, c, E, e).  
A, anti-A; B, anti-B; D, anti-D; ctl, controle; A<sub>1</sub>, eritrócitos A<sub>1</sub>; B, eritrócitos B; D, C, C<sup>w</sup>, c, E, e, antígenos Rh; Kell, antígeno K.

*amorfo* não expressam proteínas Rh e têm expressão reduzida da proteína RhAG.

A **Figura 14.9A** mostra o resultado de fenotipagem Rh de um indivíduo do grupo O RhD negativo com expressão dos antígenos 'c' e 'e' (fenótipo rr = ce/ce). A **Figura 14.9B** mostra o resultado de tipagem sanguínea de um indivíduo do grupo A com fenótipo Rh<sub>null</sub>. Pelo resultado da tipagem sanguínea, esse indivíduo seria classificado erroneamente como RhD negativo. Entretanto, de modo diferente do RhD negativo, os antígenos Rh (D, C, C<sup>w</sup>, c, E, e) estão ausentes no fenótipo Rh<sub>null</sub>. Os indivíduos Rh<sub>null</sub> produzem anticorpos anti-Rh29, que reagem contra antígenos Rh de alta frequência. Por esse motivo, só podem receber transfusão sanguínea de doadores Rh<sub>null</sub>.

**:: TIPAGEM SANGÜÍNEA RhD**

A tipagem sanguínea RhD deve ser realizada utilizando anti-D e controle do Rh. A **Figura 14.10** mostra o resultado de uma tipagem sanguínea RhD pelo método em tubo. A escolha do reagente anti-D deve seguir os critérios descritos anteriormente. O controle de Rh contém todos os reagentes do anti-D, exceto o anticorpo anti-D, deve ser da mesma marca/fabricante do anti-D e deve apresentar um resultado negativo. Um resultado

positivo invalida a classificação RhD e deve ser investigado antes da liberação do resultado (ver Métodos laboratoriais, método 2 [**Quadro 14.3**]).



**FIGURA 14.10** Tipagem sanguínea RhD positivo pelo método em tubo.

RhD, anti-D; C, controle de Rh. 0, ausência de aglutinação; 4+, aglutinação com formação de um aglutinado sólido (ver Graduação da reação de aglutinação e escore numérico).

**:: RESOLVENDO DISCREPÂNCIAS RhD**

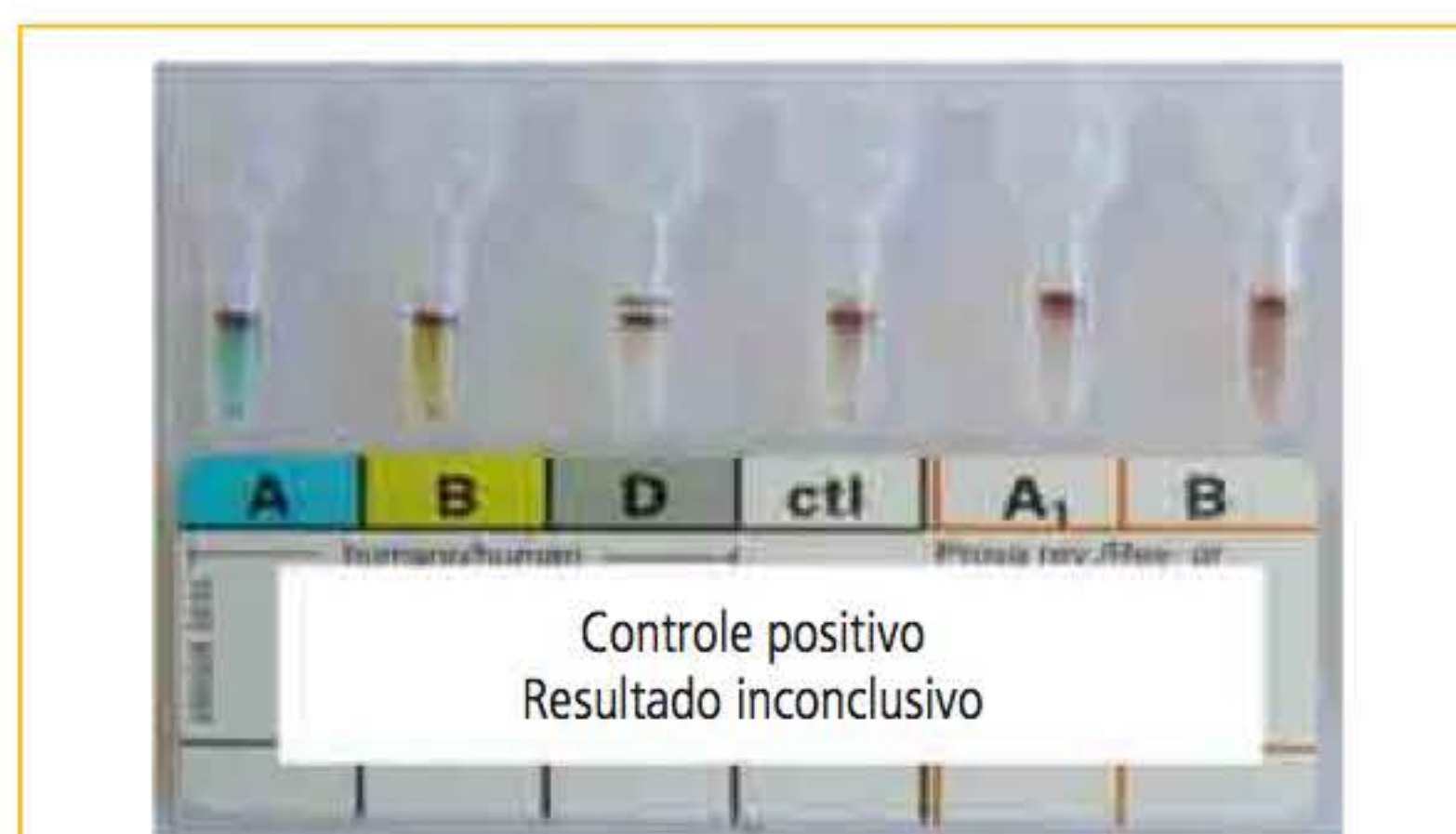
**Controle de Rh positivo**

O controle de Rh com resultado positivo invalida o teste e pode ser devido a erros técnicos, eritrócitos



sensibilizadas com anticorpos (teste de Coombs direto positivo; ex.: anemia hemolítica autoimune), poliaglutinação, formação de *rouleaux* e geleia de Wharton em sangue de cordão umbilical. A primeira providência é repetir a tipagem sanguínea e, se necessário, lavar previamente os eritrócitos com solução salina (NaCl 0,9%) aquecida a 37 °C. A resolução dessas discrepâncias foram descritas anteriormente (ver Resolvendo discrepâncias ABO).

A **Figura 14.11** mostra o resultado de uma tipagem sanguínea ABO e Rh discrepantes com controle positivo pelo método gel-teste. A amostra é de um paciente com anemia hemolítica autoimune a quente, com teste da antiglobulina direta positivo. Caso não fosse realizado o controle e a prova reversa ABO, o resultado poderia ter sido liberado equivocadamente como AB RhD positivo. Entretanto, o controle positivo invalida o resultado e devem ser realizadas técnicas complementares, como dissociação de IgG pela técnica da cloroquina seguida da técnica de bloqueio (ver Métodos laboratoriais, métodos 9 e 10).



**FIGURA 14.11** Fenotipagem ABO e RhD discrepantes com controle positivo pelo método gel-teste (BIO-RAD®).

**Nota:** Realizar teste da antiglobulina direto (Coombs direto) e se positivo, tratar os eritrócitos com difosfato de cloroquina seguido da técnica de bloqueio e, posteriormente, repetir a tipagem ABO e RhD (ver Quadros 14.10 e 14.11).

A, anti-A, B, anti-B, D, anti-D, ctl, controle, A<sub>1</sub>, eritrócitos A<sub>1</sub>, B, eritrócitos B. O resultado é inconclusivo com ctl positivo e prova direta (AB) discrepante da prova reversa (O).

### Variantes de D

Anticorpos monoclonais anti-D podem apresentar reatividade diferente, dependendo da variante de D. Resultados discrepantes entre laboratórios podem ser decorrentes da utilização de anti-D mAb de clones diferentes. As discrepâncias na fenotipagem RhD podem ser esclarecidas pela genotipagem *RHD*.

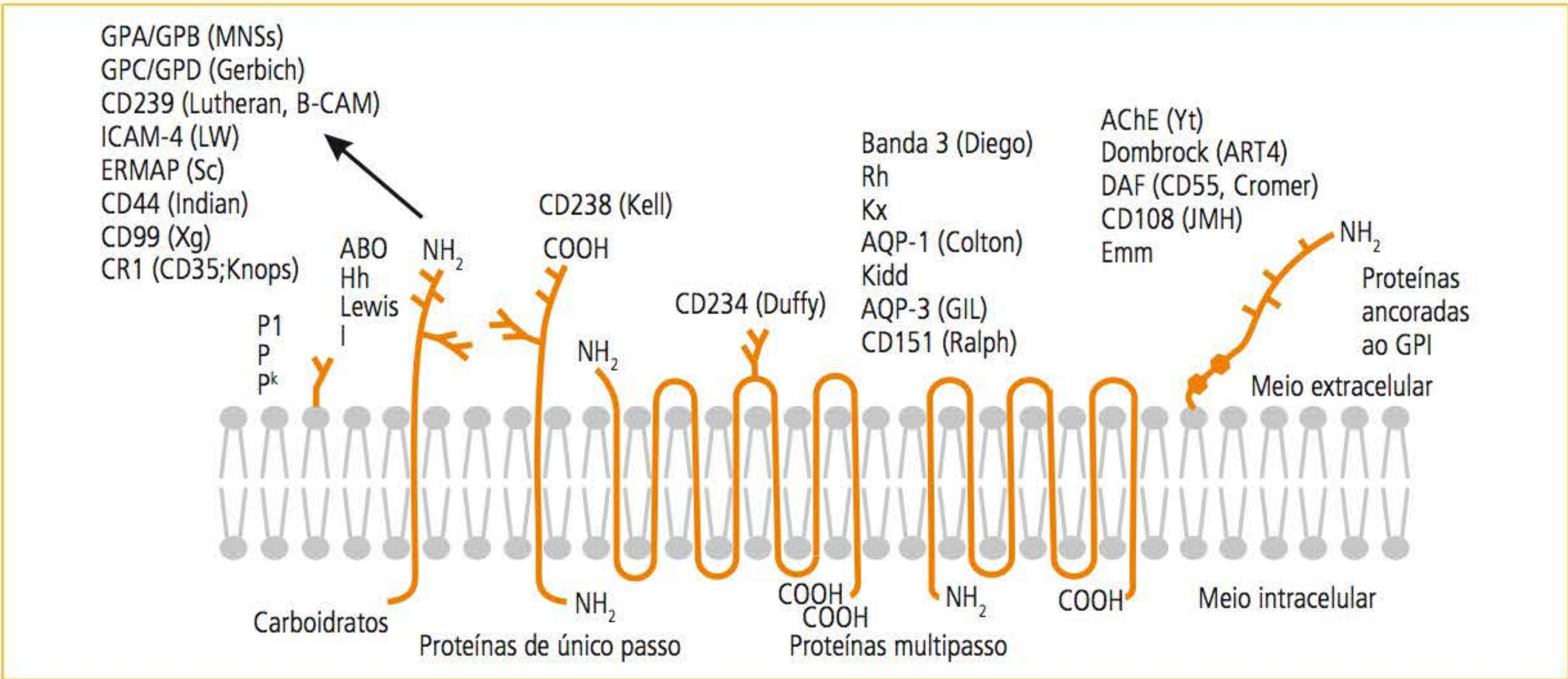
## ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA

A aloimunização eritrocitária é a formação de anticorpos (aloanticorpos) quando um indivíduo é exposto a eritrócitos que apresentam antígenos não próprios. A aloimunização pode ocorrer durante a gestação por exposição a antígenos paternos, após aborto, gravidez ectópica, transfusão sanguínea e transplante. São conhecidos mais de 300 antígenos eritrocitários classificados em 30 sistemas. Os antígenos podem ser carboidratos (ABO, H, Lewis), proteínas de um único passo (Kell, MNSs), proteínas multipasso (Rh, Duffy, Kidd, Diego) e proteínas ancoradas ao glicosil-fosfatidil-inositol – GPI (Cromer, Dombrock). A **Figura 14.12** mostra a representação esquemática dos antígenos de grupos sanguíneos. A produção de anticorpos pode ocorrer sem a sensibilização com eritrócitos. Neste caso, os anticorpos são classificados como naturais, e alguns exemplos são o anti-Le<sup>a</sup>, -Le<sup>b</sup>, -N, -I, -i, -H, -HI.

Teoricamente, qualquer antígeno poderia induzir a formação de aloanticorpos antieritrocitários. Entretanto, a aloimunização depende da genética do indivíduo (respondedor ou não respondedor), da quantidade de eritrócitos a que o indivíduo foi exposto e da imunogenicidade do antígeno eritrocitário. A imunogenicidade é definida como a habilidade do antígeno em estimular a produção de anticorpos em paciente que não possui esse antígeno. Os antígenos mais imunogênicos são, em ordem decrescente, D, K (Kell), c, E, k, e, Fy<sup>a</sup> (Duffy), C, Jk<sup>a</sup> (Kidd), S, s, Jk<sup>b</sup>. Os anticorpos produzidos após exposição com antígenos eritrocitários não próprios podem ser da classe IgM e IgG e são classificados como imunes (formados após exposição ao antígeno) e irregulares (não são esperados na população).

A aloimunização primária ocorre após a primeira exposição ao antígeno eritrocitário não próprio. O tempo de formação de aloanticorpos na aloimunização primária varia de semanas a meses, de acordo com a especificidade do anticorpo. O primeiro anticorpo a ser formado é da classe IgM, que, posteriormente, é substituído por IgG. Após cessado o estímulo, células B de memória continuam a secretar anticorpos IgG, que pode perdurar por vários anos. A concentração de anticorpos pode diminuir atingindo uma concentração abaixo do *cut-off* (valor de corte) sorológico, que é de 150 a 500 moléculas de IgG por eritrócito. Nesse caso, embora presentes, os anticorpos antieritrocitários não são detectados.



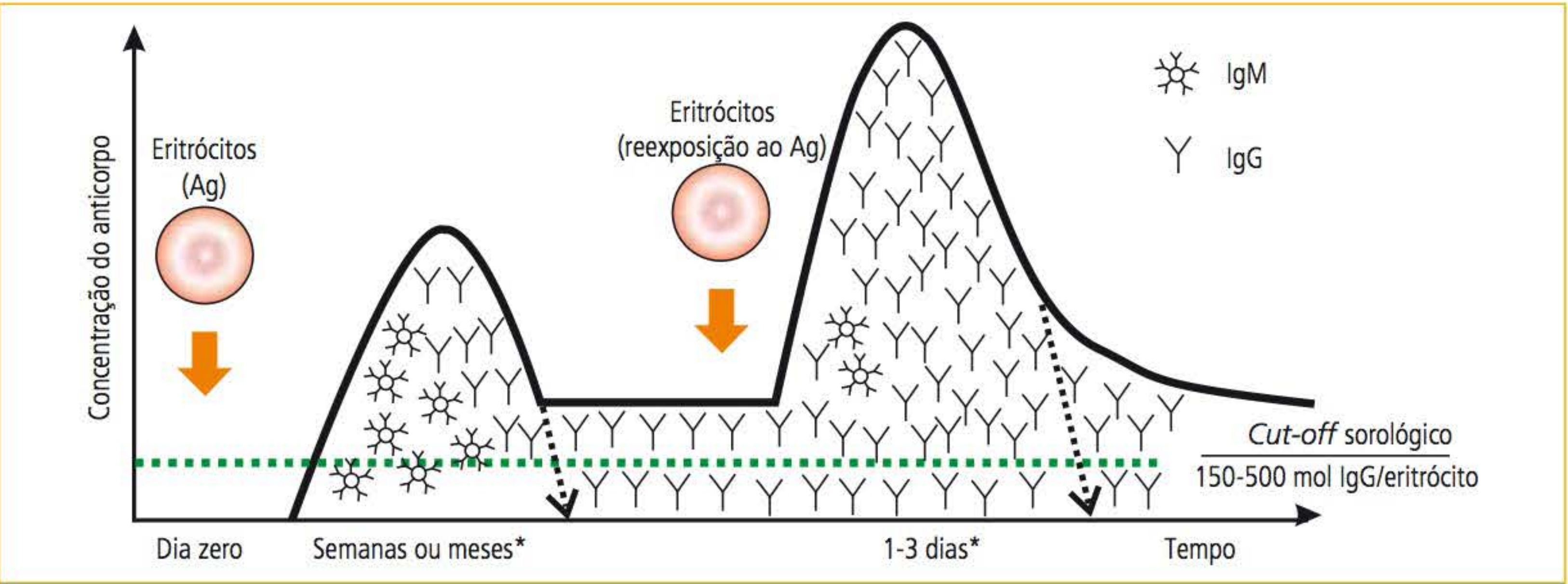


**FIGURA 14.12** Representação esquemática dos antígenos de grupos sanguíneos.

Fonte: Adaptada de Reid e Lomas-Francis.<sup>8</sup>

Após a segunda exposição ao antígeno eritrocitário, ocorre uma resposta imune humoral secundária ou anamnésica, com a produção principalmente de IgG. A formação de aloanticorpos é rápida, entre 1 a 3 dias, mas pode variar significativamente dependendo do antígeno eritrocitário envolvido. Schonewille e colaboradores<sup>9</sup> demonstraram que, geralmente, anti-Jk<sup>a</sup> e anti-Jk<sup>b</sup> estavam envolvidos em sensibilizações com intervalos

menores entre a exposição por transfusão sanguínea e a detecção do aloanticorpo (< 14 dias), enquanto anti-K e anti-Fy<sup>a</sup> eram detectados com mais de 14 dias. A concentração dos anticorpos IgG e IgM pode variar de acordo com o antígeno eritrocitário envolvido e a resposta imune individual. Alguns anticorpos envolvidos na reação hemolítica transfusional, como anti-Le<sup>a</sup>, -Le<sup>b</sup>, -N, são da classe IgM. A **Figura 14.13** mostra a



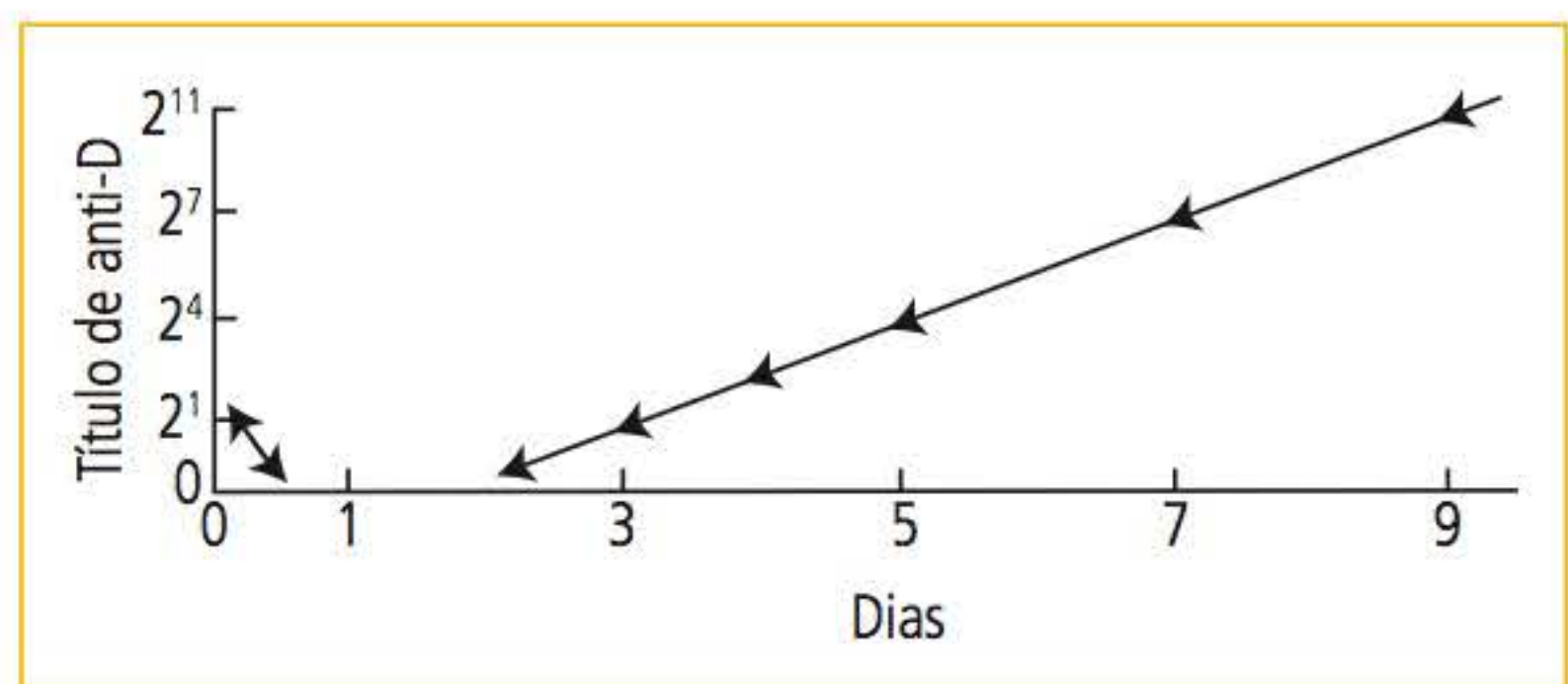
**FIGURA 14.13** Resposta imune humoral após exposição a antígenos eritrocitários.

**Notas:** \*O tempo para formação de anticorpos na resposta imune humoral primária e secundária pode variar dependendo do antígeno eritrocitário envolvido, da quantidade de eritrócitos a que o indivíduo foi exposto e de fatores genéticos. A concentração dos anticorpos IgG e IgM pode variar de acordo com o antígeno eritrocitário envolvido e a resposta imune individual. Alguns anticorpos envolvidos em reação hemolítica transfusional são da classe IgM. A resposta imune secundária pode ocorrer em até 14 dias ou mais, dependendo do antígeno eritrocitário envolvido. Após cessado o estímulo, células B de memória continuam a secretar anticorpos IgG, que pode perdurar por vários anos. A concentração de anticorpos pode diminuir (setas pontilhadas), atingindo uma concentração abaixo do cut-off sorológico, não sendo detectado no teste da antiglobulina.  
Cut-off sorológico (linha pontilhada horizontal), valor de corte dos testes sorológicos na fase de antiglobulina humana, Ag, antígeno, IgM, imunoglobulina M, IgG, imunoglobulina G, mol.IgG, moléculas de IgG.



resposta imune humoral primária e secundária após exposição a antígenos eritrocitários.

O anti-D imune começa a ser detectado em aproximadamente quatro semanas após a exposição a eritrócitos RhD positivos, atingindo níveis máximos após 6 a 8 semanas. A **Figura 14.14** ilustra a formação de anti-D em paciente após reexposição ao antígeno D com transfusão de uma unidade de concentrado de hemácias RhD positivo. O anti-D não foi detectado nos testes pré-transfusionais e, após a transfusão sanguínea, o título do aloanticorpo aumentou exponencialmente até nove dias. Dentro de 4 e 5 dias, foi estimada a total destruição das células transfundidas.



**FIGURA 14.14** Resposta imune secundária após reexposição ao antígeno D por transfusão sanguínea.

Fonte: Klein e Anstee.<sup>10</sup>

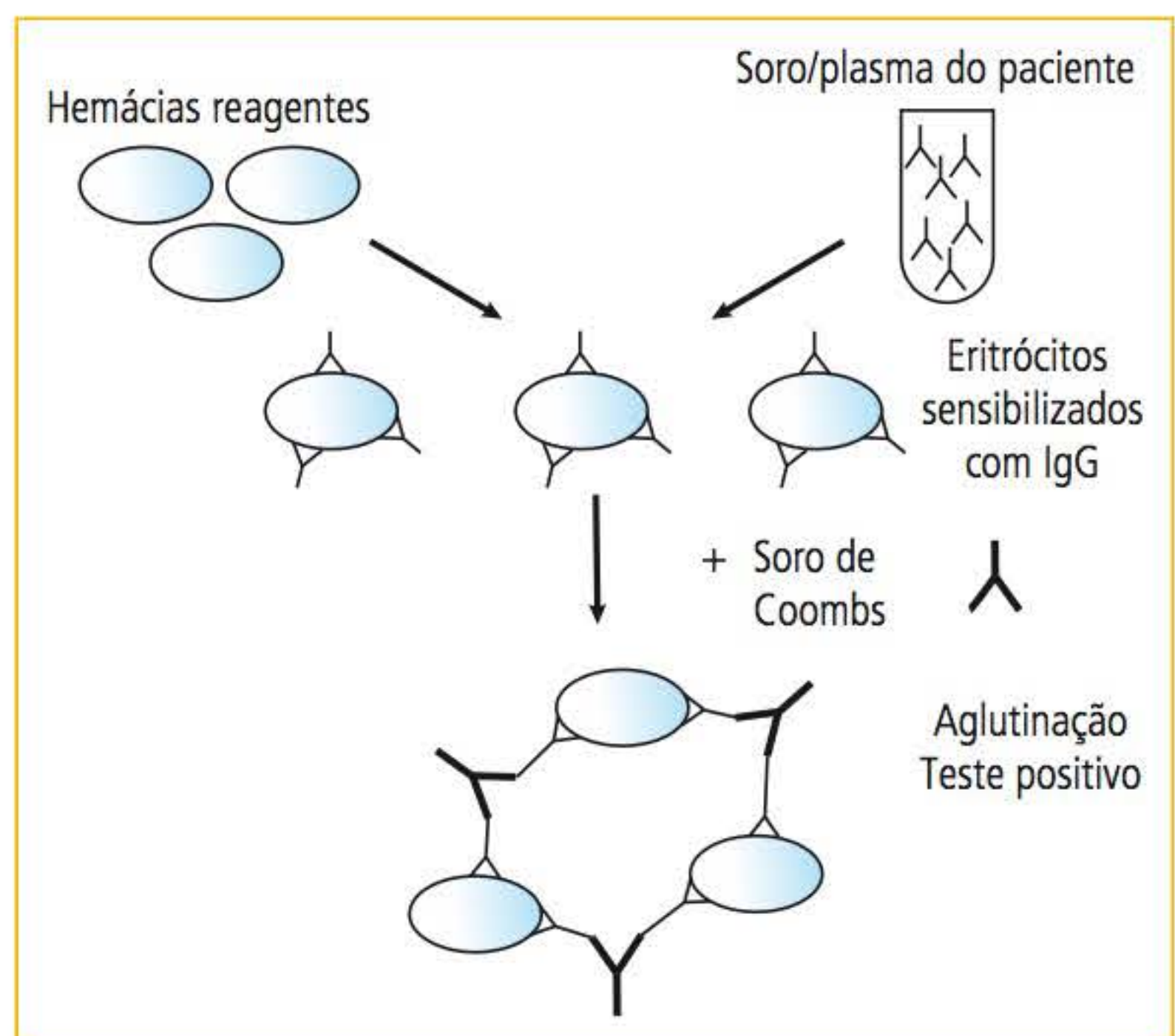
### TESTE DA ANTIGLOBULINA HUMANA (TESTE DE COOMBS)

O teste da antiglobulina humana ou teste de Coombs pesquisa anticorpos e proteínas do sistema complemento. O teste da antiglobulina tem sensibilidade para detectar entre 150 e 500 moléculas de IgG por eritrócito. Eritrócitos sensibilizados com quantidades menores de IgG podem apresentar resultado falso-negativo.

### TESTE DA ANTIGLOBULINA INDIRETO OU COOMBS INDIRETO

O teste da antiglobulina indireto (TAI), também conhecido por Coombs indireto, pesquisa anticorpos irregulares e/ou proteínas do sistema complemento no soro ou plasma. São pesquisados anticorpos IgG que não aglutinam eritrócitos em suspensão salina (incompletos). O teste é realizado incubando-se o soro ou plasma do paciente com hemácias reagentes de triagem e, após incubação a 37 °C com potencializadores (albumina, LISS ou polietilenoglicol), o soro de Coombs é adicionado. A **Figura 14.15** mostra esquematicamente o teste da antiglobulina indireto (ver Métodos laborato-

riais, método 3). O polietilenoglicol (PEG) é considerado mais sensível que a albumina e LISS. Por outro lado, o teste com PEG deve ser realizado com soro de Coombs monoespecífico e, portanto, não detecta o fragmento C3d do complemento.



**FIGURA 14.15** Teste da antiglobulina indireto (Coombs indireto).

Fonte: Hillyer e colaboradores.<sup>11</sup>

Na rotina laboratorial, são utilizados o soro de Coombs monoespecífico (anti-IgG) e o soro de Coombs poliespecífico (anti-IgG e anti-C3d; soro anti-humano), que detectam IgG e IgG/fração de complemento C3d, respectivamente. A IgM é um potente ativador do sistema complemento e pode ser detectada indiretamente pela pesquisa do C3d, fração que indica ativação do complemento na membrana eritrocitária. Eritrócitos sensibilizados com proteínas do complemento têm sobrevida diminuída e podem ser fagocitados por macrófagos pelo sistema retículo-endotelial (fragmento C3b do complemento) ou hemolisam (complexo de ataque à membrana, complexo C5-C9 do complemento).

### Hemácias reagentes

O TAI deve detectar a maioria dos anticorpos irregulares clinicamente significantes, que são anticorpos associados com reação hemolítica pós-transfusional ou DHFN. A **Tabela 14.5** mostra a importância clínica dos principais anticorpos anti-eritrocitários. Geralmente, anticorpos IgG reagem a 37 °C (anticorpos quentes), e anticorpos IgM reagem a temperaturas < 32 °C, com melhor reatividade a 4 °C (anticorpos frios). Os anticorpos clinicamente significantes, em geral, reagem a 37 °C. Anticorpos que reagem à temperatura



TABELA 14.5 Importância clínica dos anticorpos antieritrocitários					
ANTÍGENO	SISTEMA	CLASSE DO ANTICORPO		CONSEQUÊNCIAS CLÍNICAS	
		IgM	IgG	RHT	DHFN
A	ABO	x	x	Leve a grave	Nenhuma a moderada
B	ABO	x	x	Leve a grave	Nenhuma a moderada
D	Rh	x	x	Leve a grave	Leve a grave
C	Rh		x	Leve a grave	Leve
E	Rh	x	x	Leve a grave	Leve
C	Rh	x	x	Leve a grave	Leve a grave
E	Rh		x	Leve a moderada	Rara
K	Kell	x	x	Leve a grave	Leve a grave
Fy <sup>a</sup>	Duffy		x	Leve a grave	Leve a grave
Fy <sup>b</sup>	Duffy		x	Leve a grave	Leve
Jk <sup>a</sup>	Kidd		x	Nenhuma a grave	Leve a moderado
Jk <sup>b</sup>	Kidd		x	Nenhuma a grave	Nenhuma a leve
M	MNS	x	x	Nenhuma (exceto se reativo a 37 °C)	Nenhuma a leve (raramente grave)
N	MNS	x		Nenhuma (exceto se reativo a 37 °C)	Nenhuma
S	MNS		x	Nenhuma a moderada	Nenhuma a grave
S	MNS		x	Nenhuma a leve	Nenhuma a grave
Le <sup>a</sup>	Lewis	x		Rara	Nenhuma
Le <sup>b</sup>	Lewis	x		Rara	Nenhuma
Di <sup>a</sup>	Diego		x	Moderada a grave	Moderada a grave

RHT, reação hemolítica transfusional; DHFN, doença hemolítica do feto e do recém-nascido.  
**Fonte:** Adaptada de Harmening,<sup>3</sup> Reid e Lomas-Francis,<sup>8</sup> e Hillyer e colaboradores.<sup>11</sup>

ambiente são importantes clinicamente se reagirem até 37 °C.

O TAI deve ser realizado com hemácias reagentes do grupo O RhD positivo, fenotipados para os principais antígenos de importância clínica. Recomenda-se a utilização de dois frascos de células comerciais, um contendo eritrócitos de doador R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (DCE/DCE) e outro com eritrócitos de doador R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (DcE/DcE). As hemácias reagentes devem expressar os antígenos C, c, D, E, e, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s, M, N, Le<sup>a</sup>. Outra recomendação é que os antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s estejam expressos em homozigose para evitar falso-negativo por efeito de dose. Quando o antígeno é expresso em heterozigose (p. ex., Fy(a+b+)), o teste pode apresentar resultado falso-negativo pela expressão diminuída do antígeno (efeito de dose). No Brasil, também devem ser incluídas células de triagem que expressem o antígeno Di<sup>a</sup> (sistema Diego). Essa necessidade é

justificada pela alta frequência de indivíduos Di(a+) (5,5%) em relação ao relatado na literatura (< 0,1% em brancos) e pela presença não rara de pacientes sensibilizados com anti-Di<sup>a</sup>. Os anticorpos anti-Di<sup>a</sup> estão associados com DHFN e com reação hemolítica transfusional (RHT).

O teste da antiglobulina indireto não deve ser realizado com *pool* de eritrócitos O RhD positivo, pois detectaria somente anti-D e não os demais anticorpos clinicamente significantes.

**Eritrócitos-controle de COOMBS**

Os eritrócitos-controle de Coombs são células revestidas por anticorpos IgG que aglutinam na presença do soro de Coombs. Geralmente, são utilizadas células comerciais do grupo O RhD positivo sensibilizadas com anti-D IgG. Os eritrócitos-controle de Coombs são adicionados após um teste não reagente (negativo) com o soro de Coombs e devem aglutinar.



Se as células-controle de Coombs não aglutinarem, o resultado é inválido, e o teste deve ser repetido. Uma possível causa é a lavagem inadequada dos eritrócitos antes da adição do soro de Coombs. Nesse caso, ocorre a neutralização do soro de Coombs com IgG presente no plasma do paciente. Outras causas são a não adição do soro de Coombs ou devido a um soro de Coombs sem reatividade (vencido ou contaminado com IgG).

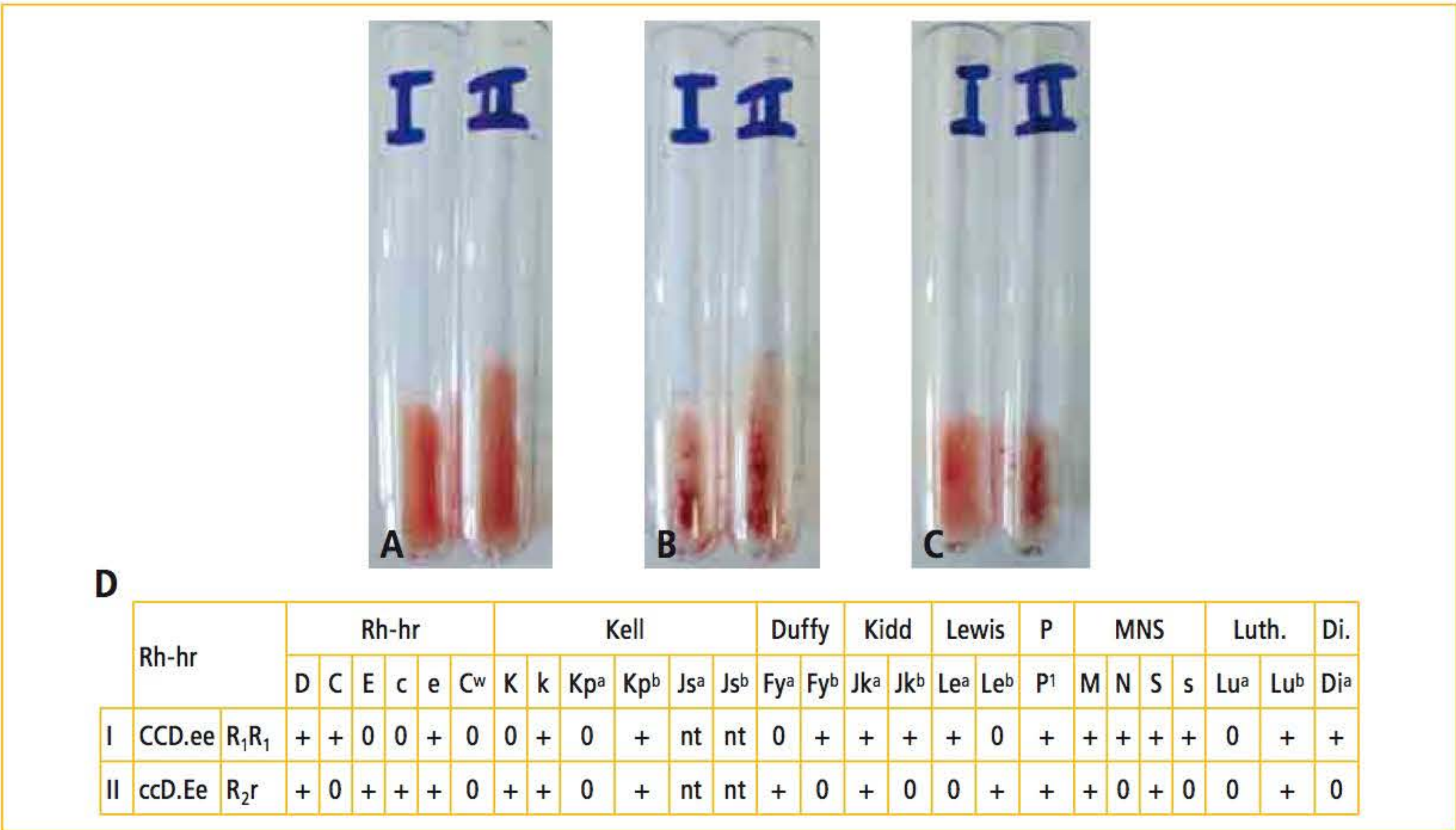
A **Figura 14.16** mostra o resultado de um teste da antiglobulina indireto (Coombs indireto) com resultado não reagente e aglutinação eritrocitária após adição de eritrócitos-controle, um teste de Coombs indireto reagente na célula II e o diagrama para interpretação dos resultados.

**Teste da antiglobulina indireto em gestantes**  
Aproximadamente 1% das gestantes apresenta anticorpos antieritrocitários clinicamente significantes. Os anticorpos envolvidos na DHFN são da classe IgG (subclasses IgG1 e IgG3), que atravessam a placenta e se ligam nos eritrócitos fetais,

diminuindo a sobrevida eritrocitária fetal. Anticorpos da classe IgM e IgA não atravessam a placenta e não têm importância clínica.

Na maioria dos laboratórios do Brasil, o TAI é realizado em gestantes RhD negativo com o objetivo de detectar anti-D. Entretanto, vários anticorpos irregulares estão associados com DHFN. A **Tabela 14.5** mostra a importância clínica dos principais anticorpos antietritocitários.

Com a implementação da imunoprofilaxia Rh (IgG anti-D), houve um decréscimo da aloimunização anti-D para cerca de 1,2%. Após a introdução da imunoprofilaxia no terceiro trimestre de gestação, a aloimunização diminuiu para 0,17 a 0,28%. Como consequência, houve redução dos casos de DHFN por anti-D, e outros anticorpos não D emergiram como importante causa de DHFN grave, sendo os mais frequentes o anti-K (Kell) e o anti-c. O anti-K causa destruição dos



**FIGURA 14.16** Resultado do teste da antiglobulina indireto (Coombs indireto) pelo método em tubo. (A) Coombs indireto não reagente (ausência de aglutinação nas células I e II). (B) Aglutinação eritrocitária nos tubos I e II após adição de eritrócitos-controle de Coombs.\* (C) Coombs indireto reagente (aglutinação da célula II).\*\* (D) Diagrama para interpretar o teste da antiglobulina indireto.

**Notas:** \*A aglutinação eritrócitos-controle valida o teste de Coombs.  
\*\*Deve ser realizada a identificação do anticorpo antieritrocitário irregular para avaliar a importância clínica. A aglutinação no tubo contendo as células II sugere a presença de um anticorpo contra antígenos presentes nestes eritrócitos. De acordo com o diagrama do item (d) a seguir, os possíveis anticorpos são: anti-E, -c, -K, -Fy<sup>a</sup>, -Le<sup>b</sup>. A especificidade do anticorpo deve ser determinada pela identificação de anticorpos antieritrocitários.  
\*\*\*Tabela com antígenos eritrocitários dos sistemas de grupo sanguíneo Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, P, MNS, Lutheran e Diego; I e II, eritrócitos de dois doadores com fenótipo conhecido; 0, ausência do antígeno eritrocitário; +, presença do antígeno eritrocitário, nt, não testado.

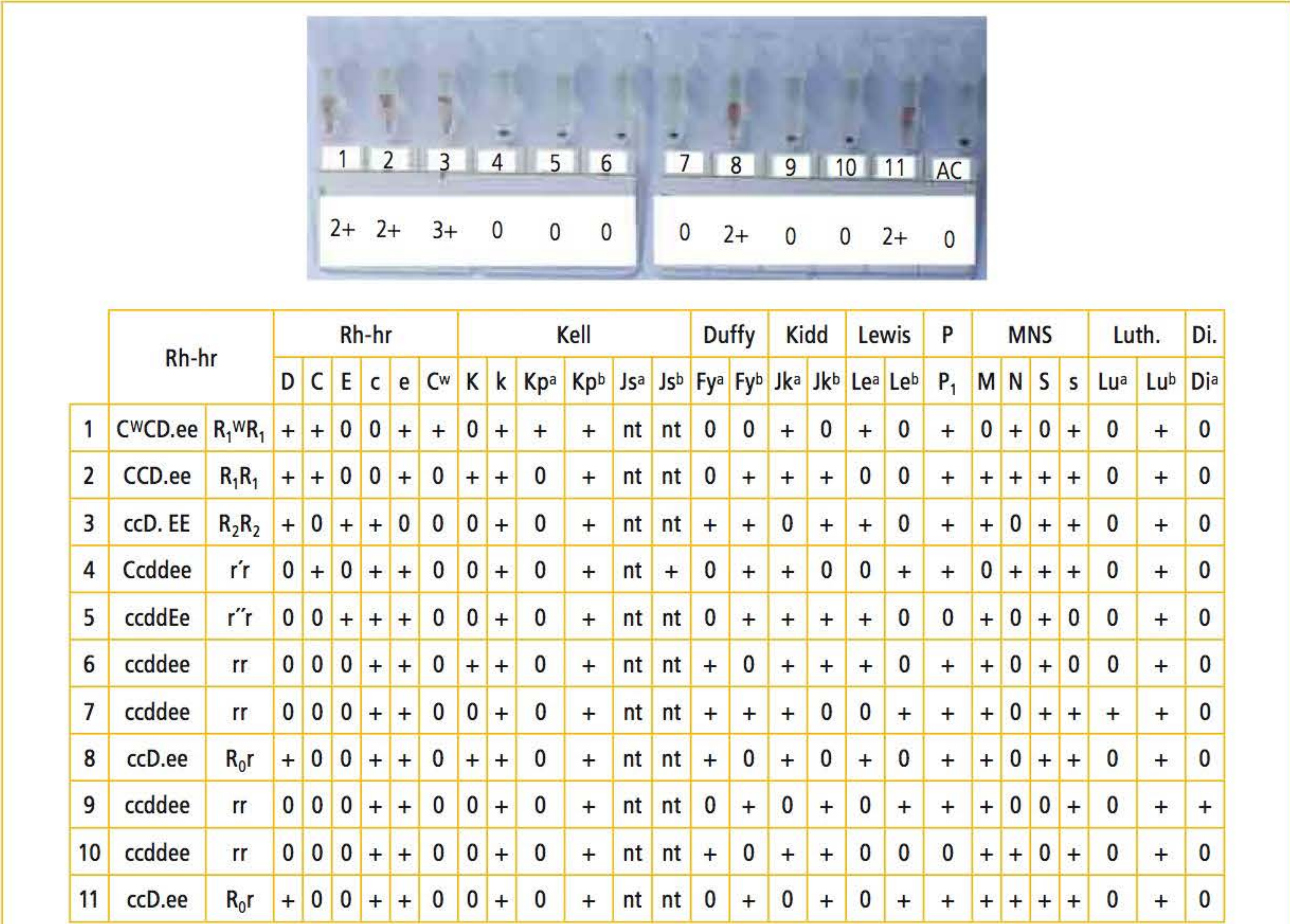


progenitores eritroides, impedindo a formação de eritrócitos e podendo levar a hidropsia fetal e óbito, se não houver intervenção clínica. Além desses, outros anticorpos mais comumente associados com DHFN são anti-C, -E, -Fy<sup>a</sup> e -Jk<sup>a</sup>.

Gestantes RhD positivo são capazes de produzir aloanticorpos não D da mesma forma que gestantes RhD negativo. Na maioria dos países desenvolvidos, tem sido implementada a pesquisa de aloanticorpos antieritrocitários em todas as gestantes RhD negativo e RhD positivo, para detectar anti-D e outros anticorpos associados à DHFN. Nesses países (ex. Reino Unido e Holanda), o TAI é realizado em todas as pacientes com cerca de 12 semanas de gestação e repetido na 28ª semana.

**IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IRREGULARES**

Quando o TAI é reagente (positivo), o anticorpo antieritrocitário deve ser identificado para verificar sua importância clínica. A especificidade é determinada utilizando um painel de 11 frascos de hemácias comerciais fenotipadas e um tubo com autocontrole (soro ou plasma e eritrócitos do próprio paciente). A leitura dos tubos com aglutinação é comparada com um diagrama, e a especificidade, determinada. O tubo autocontrole (AC) é realizado com o soro/plasma do paciente e seus próprios eritrócitos para excluir autoanticorpos (p. ex., AHAI). A **Figura 14.17** mostra o resultado da identificação de anticorpos irregulares pelo método de gel-teste.



**FIGURA 14.17** Identificação de anticorpos irregulares (anti-D) pelo método gel-teste (BIO-RAD®). (A) Resultado do painel com 11 células e autocontrole.\* (B) Diagrama para identificação do anticorpo irregular com antígenos eritrocitários dos sistemas de grupo sanguíneo Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, P, MNS, Lutheran e Diego.\*\*

**Notas:** \*Os microtubos 1, 2, 3, 8 e 11 apresentaram reação positiva.  
\*\* Especificidade do anticorpo (anti-D); o antígeno D está presente nas células 1,2, 3, 8 e 11, que aglutinaram (reação positiva) com a amostra do paciente.  
Em (A): 0, ausência de aglutinação; 2+/3+, graduação da aglutinação; AC, autocontrole negativo. Em (B) 1 a 11, eritrócitos de 11 doadores com fenótipo conhecido; 0, ausência do antígeno eritrocitário; +, presença do antígeno eritrocitário; nt, não testado.



## :: QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES

Em gestantes, após determinada a especificidade do anticorpo e confirmada a importância clínica, o anticorpo irregular deve ser quantificado para avaliar o risco de hemólise fetal. A quantificação dos anticorpos pode ser realizada com analisador de fluxo contínuo, citometria de fluxo, titulação de anticorpos pelo teste da antiglobulina indireto pelo método em tubo ou titulação de anticorpos pelo método de gel-teste utilizando o escore.

### QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIERITROCITÁRIOS COM ANALISADOR DE FLUXO CONTÍNUO

A quantificação de anticorpos utilizando um analisador de fluxo contínuo tem uma reprodutibilidade e acurácia superiores à titulação manual pelo TAI. O teste é realizado com eritrócitos específicos para o anticorpo, tratados com bromelina. Para quantificação de anti-D e anti-c, são utilizados eritrócitos do grupo O R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (DcE/DcE) e rr (ce/ce), respectivamente. O plasma da gestante é diluído e incubado a 37 °C com os eritrócitos. Após incubação, os eritrócitos sensibilizadas com anticorpo formam *rouleaux* e são separados dos eritrócitos não sensibilizados pela adição de um reagente de dispersão. O eritrócito não sensibilizados ressuspensos no sobrenadante são hemolisados, e a absorbância é medida em comprimento de onda de 550 nm. A absorbância reflete o número de células que não aglutinaram e é inversamente proporcional à concentração do anticorpo. O resultado é comparado com uma curva-padrão do anticorpo pesquisado, com concentrações conhecidas. A concentração considerada crítica para anti-D é de 4 UI/mL; com risco moderado de DHFN, entre 4 e 15 UI/mL, e alto risco para hidropsia fetal se a concentração for superior a 15 UI/mL. Para o anti-c, as concentrações consideradas críticas são de 7,5 a 20 UI/mL (risco moderado de DHFN) e superior a 20 UI/mL (alto risco de DHFN).

### QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIERITROCITÁRIOS COM CITOMETRIA DE FLUXO

A quantificação de anticorpos por citometria de fluxo tem reprodutibilidade e acurácia superiores à titulação de anticorpos em tubo. Os eritrócitos são incubados com anticorpos conjugados com fluoróforos. Quando os eritrócitos atravessam o citômetro de fluxo, incide uma luz *laser*, que provoca

emissão de fluorescência, detectada por fotodetectores. A concentração do anticorpo é proporcional à intensidade da fluorescência emitida.

## :: TITULAÇÃO DE ANTICORPOS PELO TESTE DA ANTIGLOBULINA INDIRETO (TAI) EM TUBO

Embora a técnica utilizando o analisador de fluxo contínuo e a citometria de fluxo tenham maior reprodutibilidade e acurácia, são técnicas com maior custo, o equipamento é de difícil manutenção e necessitam de um técnico especializado para obter resultados satisfatórios. Por essa razão, a titulação de anticorpos pelo TAI é o método mais utilizado. Essa técnica é semiquantitativa e determina o título dos anticorpos no soro, definido como a maior diluição do soro que apresenta reação positiva  $\geq 1+$  com eritrócitos específicos (método 7). O título deve ser expresso pelo número da maior diluição (p. ex., diluição 1:32; título = 32).

O título de anticorpos anti-D igual ou maior que 16 é considerado importante clinicamente e requer investigação pelo clínico. Para o anti-K (Kell), alguns autores consideram o título crítico igual a 8, embora títulos menores possam causar DHFN grave. Para os demais anticorpos, não há um título definido.

A titulação do anti-D não pode ser realizada com qualquer eritrócito RhD positivo. A seleção dos eritrócitos é controversa. Alguns autores recomendam utilizar eritrócitos R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (DcE/DcE) por ter expressão mais forte do antígeno D e apresentar menor variação na expressão dos antígenos D na população. Outros autores recomendam a utilização do fenótipo R<sub>1</sub>r (DCe/ce), que expressa uma única dose do antígeno D. O importante é a padronização do teste. Se uma amostra for titulada com eritrócitos R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, esse fenótipo deve ser utilizado para uma titulação futura.

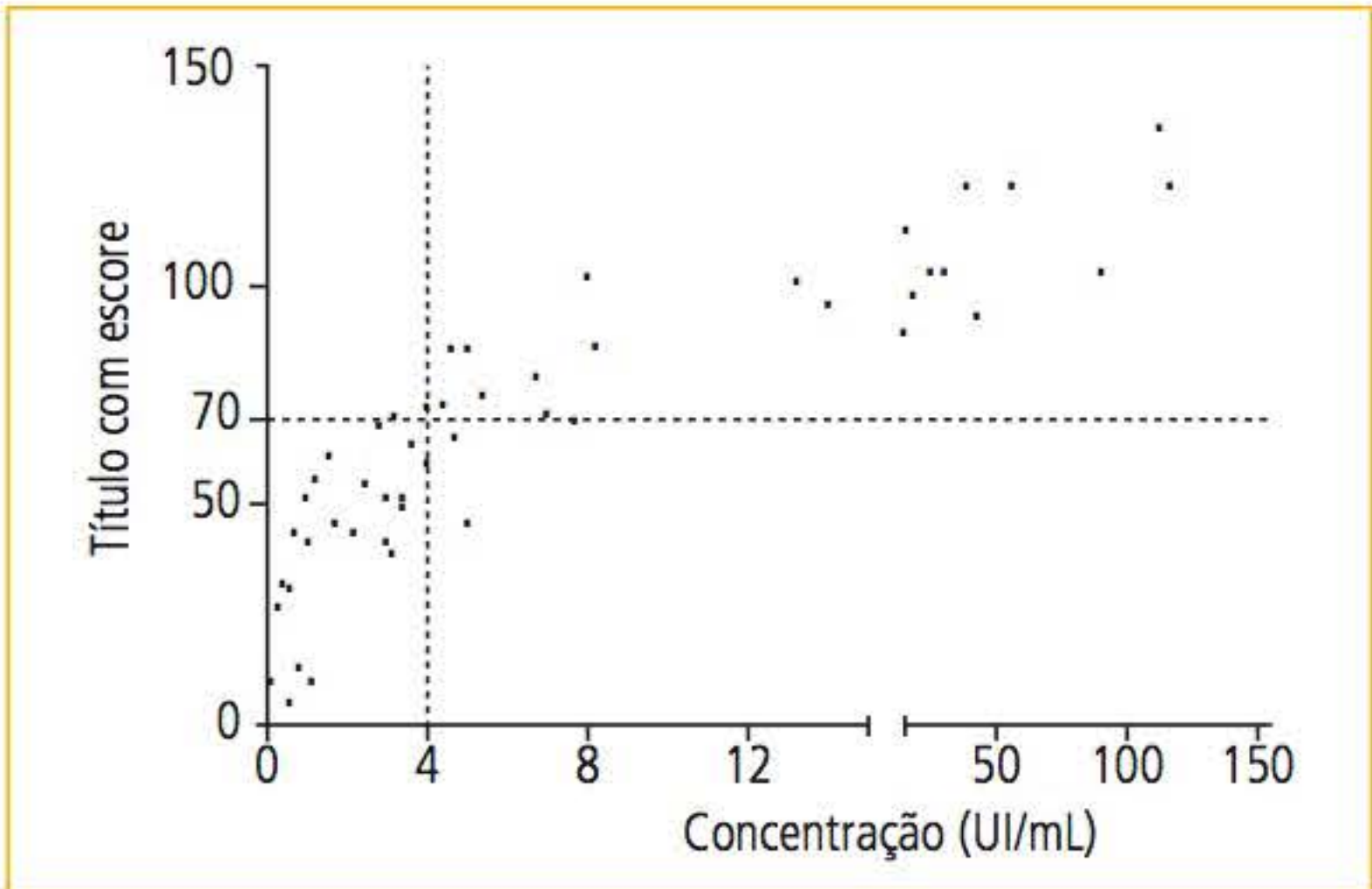
Para verificar se houve aumento de título de anticorpos, a titulação deve ser realizada com duas amostras simultaneamente. A primeira amostra deve ser congelada e repetida juntamente com a amostra subsequente. A variação de dois ou mais títulos entre duas amostras indica estímulo na produção de anticorpos.

## :: TITULAÇÃO DE ANTICORPOS PELO MÉTODO DE GEL-TESTE UTILIZANDO ESCORE

A titulação é um método simples, mas é limitada por fornecer um resultado semiquantitativo; pela



falta de acurácia, a interpretação é subjetiva e tem uma baixa reprodutibilidade relativa. Um estudo recente, comparando o método em gel-teste para titulação de anti-D e anti-c utilizando o título com escore com a quantificação utilizando analisador de fluxo contínuo, apresentou boa reprodutibilidade e sensibilidade. A quantificação de anti-D pelo título com escore maior ou igual a 70 foi associada com a concentração de 4 UI/mL (analisador de fluxo contínuo), considerada crítica para intervenção pelo clínico. A **Figura 14.18** compara a quantificação do anti-D em analisador de fluxo contínuo (UI/mL) com o título com escore pelo método de gel-teste. Para anti-c, o título com escore maior ou igual a 40 foi associado com a concentração de 7,5 UI/mL (crítica). Os resultados demonstraram que o método em gel-teste pode ser uma alternativa melhor que a titulação em tubo quando a quantificação de anticorpos com analisador de fluxo contínuo não estiver disponível; entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar o escore que deve ser considerado crítico.



**FIGURA 14.18** Quantificação do anti-D com analisador de fluxo contínuo (UI/mL) comparada com o título com escore pelo método de gel-teste (n=50).

Fonte: Bruce e colaboradores.<sup>12</sup>

**FENOTIPAGEM PATERNA**

Quando um anticorpo clinicamente significativo (causador de DHFN) é identificado na gestante (especialmente anti-D, -c, -K), recomenda-se realizar a fenotipagem paterna para prever se o feto expressa o antígeno eritrocitário específico.

**GENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA FETAL**

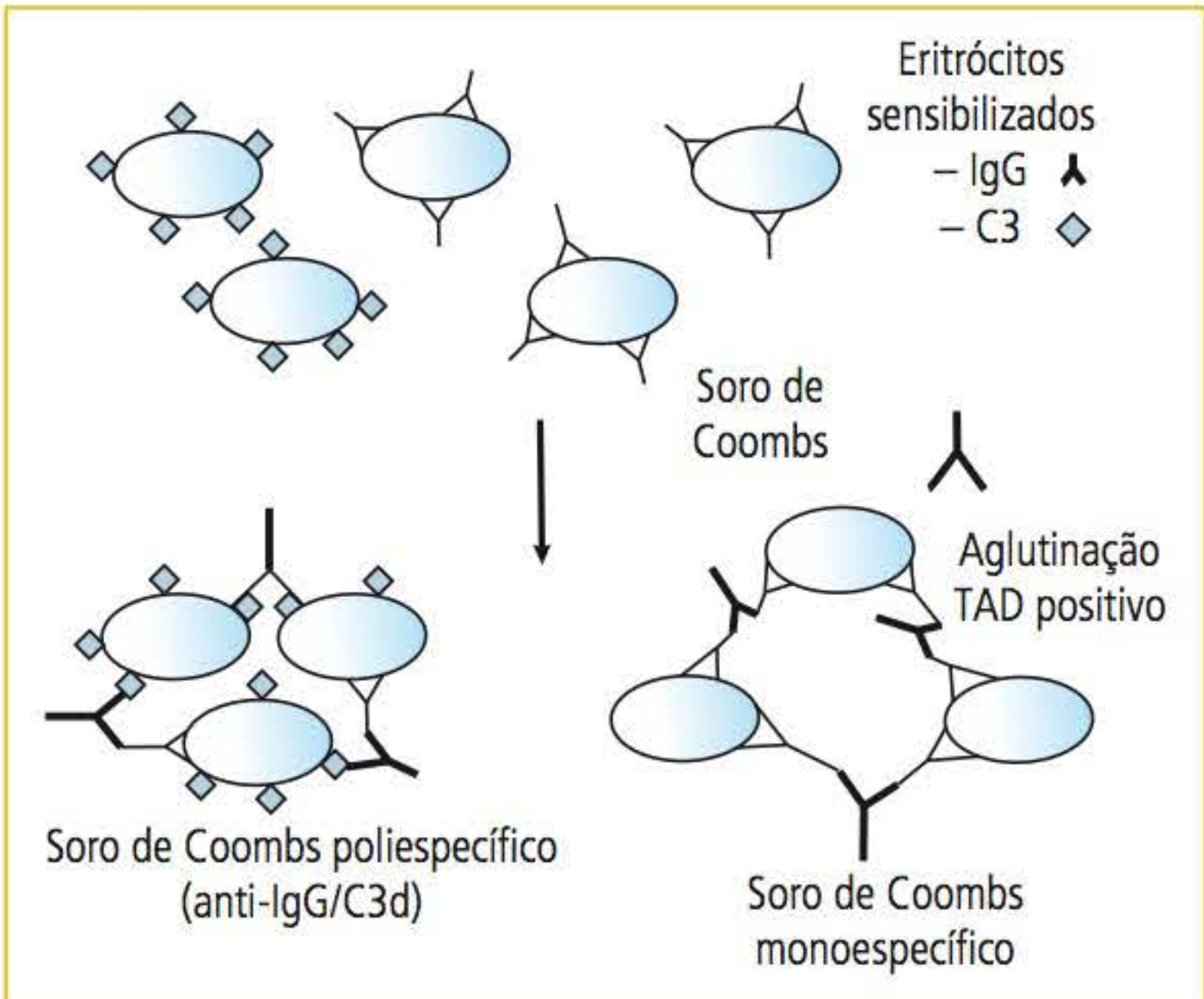
A genotipagem eritrocitária fetal é recomendada quando um anticorpo clinicamente significativo (causador de DHFN) está presente em alta

concentração (título crítico) ou o pai é heterozigoto para o antígeno em questão. A genotipagem eritrocitária fetal pode ser realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) em tempo real com amostra obtida por amniocentese e biópsia de vilosidades coriônicas, mas esses procedimentos são invasivos e estão associados com aumento de risco de hemorragia transplacentária e aborto espontâneo.

Foi demonstrado que, a partir de 16 semanas de gestação, DNA fetal livre está presente no plasma materno em concentrações suficientes para a genotipagem fetal por PCR em tempo real, sendo essa a amostra de escolha por ser menos invasiva e de menor risco.

**TESTE DA ANTIGLOBULINA DIRETO OU COOMBS DIRETO**

O teste da antiglobulina direto (TAD) pesquisa anticorpos IgG ou fração C3d do complemento fixados *in vivo* na membrana eritrocitária. Também podem ser pesquisados fragmento C3c do complemento e anticorpos IgA e IgM com antiglobulinas específicas. O TAD é realizado com eritrócitos do paciente previamente lavados com solução salina (NaCl 0,9%) e adição do soro de Coombs poliespecífico e monoespecífico. A **Figura 14.19** mostra esquematicamente o teste da antiglobulina direto (ver Métodos laboratoriais, método 5). Amostras de cordão umbilical devem ser lavadas de 6 a 8 vezes com solução salina para evitar resultado falso-positivo pela presença da geleia de Wharton.



**FIGURA 14.19** Teste da antiglobulina direto (Coombs direto).

Fonte: Hillyer e colaboradores.<sup>11</sup>



A realização do TAD é indicada em casos de anemia hemolítica autoimune e induzida por drogas no caso de DHFN (sangue do recém-nascido) e reação transfusional. A prevalência de TAD positivo em doadores de sangue saudáveis varia entre 1 em 1.000 a 1 em 14.000. Um resultado de TAD positivo não significa necessariamente hemólise, mas que o eritrócito está sensibilizado por anticorpos e/ou C3d. A hemólise deve ser avaliada com outros testes como hemoglobina, hematócrito, LDH, haptoglobina e bilirrubinas. Por outro lado, um paciente com TAD negativo pode apresentar hemólise.

Historicamente, o TAD em sangue de cordão umbilical era um dos testes utilizados para detectar DHFN em recém-nascidos RhD positivo e mãe RhD negativo. Com a implementação da imunoprofilaxia Rh antenatal na 28ª semana da gestação, o anti-D IgG passivo pode ser detectado no plasma da gestante por 8 a 12 semanas e atravessa a placenta, sensibilizando eritrócitos fetais. Estudos recentes demonstraram que o TAD em sangue de cordão apresenta um baixo valor preditivo positivo, já que menos de 25% dos recém-nascidos com TAD reagente desenvolveram icterícia. Por essas razões, alguns autores não recomendam a realização do TAD na análise de rotina em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes RhD negativo que receberam a imunoprofilaxia Rh na 28ª semana da gestação. Nesses casos, é recomendada a realização do TAD em pacientes que apresentarem icterícia.

#### METODOLOGIAS UTILIZADAS NA IMUNO-HEMATOLOGIA ERITROCITÁRIA

Os testes disponíveis na imuno-hematologia eritrocitária podem ser realizados em lâmina, tubos de ensaio, microplacas, aglutinação em coluna (gel-teste), ensaio de aderência de eritrócitos em fase sólida e tecnologia dos eritrócitos magnetizados.

A associação de dois ou mais métodos fornece resultados mais confiáveis em relação a um teste isolado. Os laboratórios de referência e hemocentros realizam dois ou mais testes.

#### ❑ MÉTODO EM LÂMINA

O método em lâmina deveria ser utilizado somente se não houvesse equipamentos disponíveis para realizar outro método. O teste em lâmina deve ser lido em 1 a 2 minutos para evitar evaporação de água, o que pode produzir um resultado falso-positivo. Adicionalmente, a aglutinação eritrocitária é exacerbada com a centrifugação, e alguns

anticorpos IgG necessitam de centrifugação para serem detectados. Por esses motivos, esse método deve ser utilizado apenas no controle de qualidade para a determinação da avidéz dos antissoros.

#### ❑ MÉTODO EM TUBO

O método em tubo é o mais utilizado na rotina laboratorial no Brasil. O método é de fácil execução, baixo custo e indicado para rotinas menores. A padronização da execução do teste e da leitura é essencial para resultados confiáveis. A leitura por dois técnicos aumenta a segurança dos resultados. Para rotinas maiores, o método em tubo não é recomendado por não permitir automação e possibilitar erros técnicos com maior frequência. O método em tubo é menos sensível para detecção de anticorpos antieritrocitários clinicamente significantes que o gel-teste e o teste de aderência de eritrócitos em fase sólida.

#### ❑ MÉTODO EM MICROPLACA

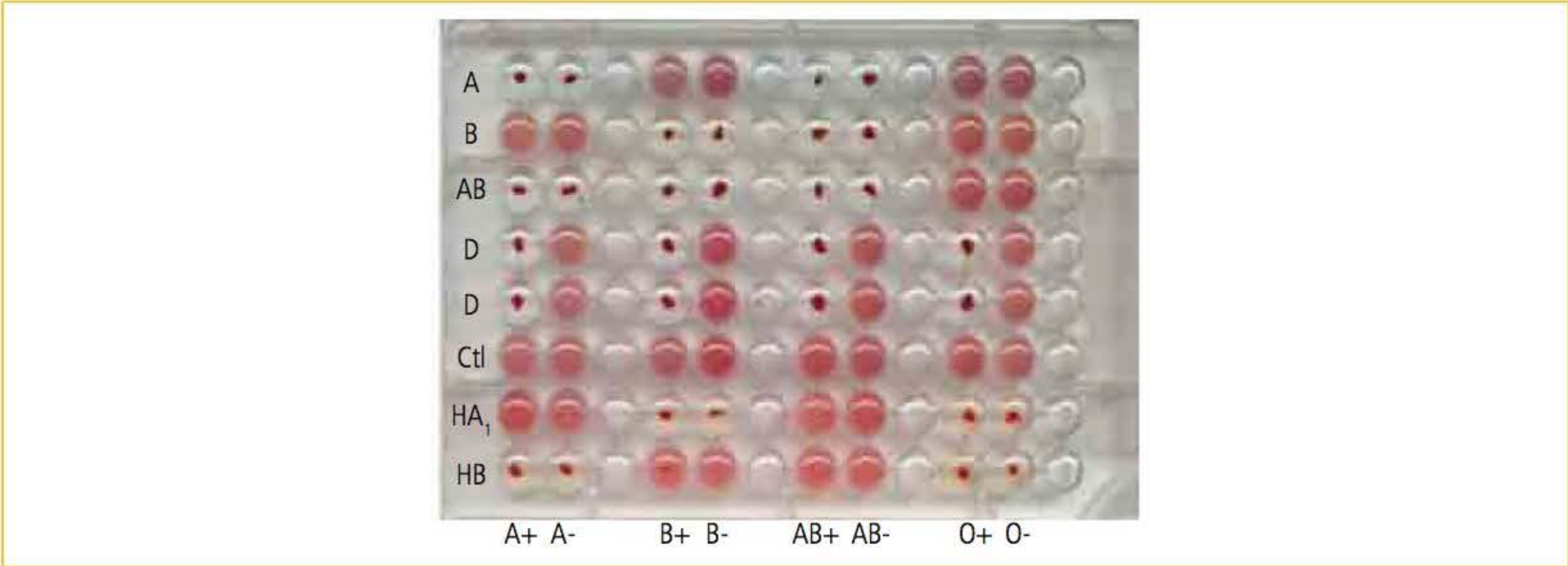
A tipagem sanguínea pode ser realizada em microplaca contendo antissoros liofilizados. Os eritrócitos a serem testados são tratados previamente com bromelina e posteriormente adicionados nas microcavidades. A **Figura 14.20** mostra o resultado da tipagem sanguínea ABO e RhD pelo método em microplaca. O método em microplaca permite a automação total ou apenas da leitura da microplaca, aumentando a segurança. A técnica em microplaca apresenta menor sensibilidade para detecção de anticorpos antieritrocitários em relação ao método de gel-teste.

#### ❑ MÉTODO DE AGLUTINAÇÃO EM COLUNA (GEL-TESTE)

O método de aglutinação em coluna utiliza cartões de plástico com 6 a 8 microtubos contendo um gel transparente (BIO-RAD® e Grifols®) ou microesferas de vidro (Ortho-Clinical Diagnostics®) e antissoros específicos.

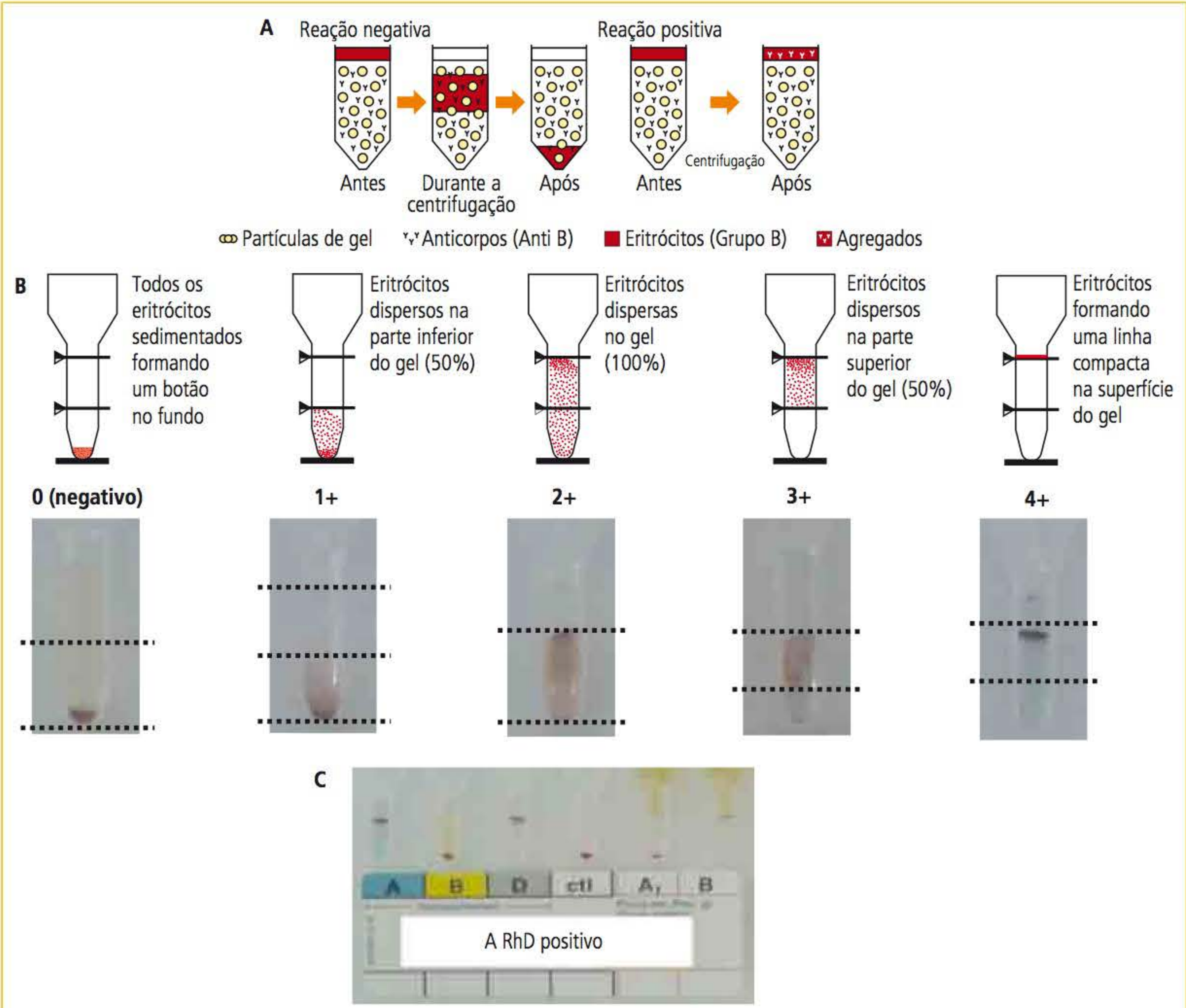
Os eritrócitos a serem testados são dispensados na região superior da coluna de gel e incubados conforme preconizado pelo fabricante. Os cartões são centrifugados e, se não houver a reação antígeno-anticorpo, os eritrócitos atravessam totalmente o gel e se depositam no fundo dos microtubos (reação negativa = 0). Quando a reação é positiva, os eritrócitos aglutinados não atravessam o gel, ficando retidos na camada superior do gel (4+) ou distribuídos pelos microtubos (1+ a 3+). A **Figura 14.21** mostra a interpretação de uma reação de aglutinação eritrocitária negativa e positiva (21a), a interpretação da graduação da aglutinação eritrocitária





**FIGURA 14.20** Tipagem sanguínea ABO e RhD em microplaca – imagem do fundo da microplaca.

A, B, AB, D, antissoros específicos; ctl, controle de Rh; HA<sub>1</sub> e HB, eritrócitos A<sub>1</sub> e B para a prova reversa. Aglutinação, eritrócitos formam um botão na microcavidade; reação negativa, eritrócitos em suspensão não aglutinados.



**FIGURA 14.21** Método de gel-teste (BIO-RAD®). (A) Reação negativa e positiva. (B) Graduação da reação de aglutinação em gel. (C) Fenotipagem ABO e RhD pelo método de gel-teste (BIO-RAD®).

0, ausência de aglutinação; 1+ a 4+, reação positiva (ver Graduação da reação de aglutinação e escore numérico); A, anti-A; B, anti-B; D, anti-D; ctl, controle; A<sub>1</sub>, eritrócitos A<sub>1</sub>; B, eritrócitos B.



(21b) e o resultado de fenotipagem sanguínea ABO e RhD (21c) pelo método de gel-teste. O método de aglutinação em coluna é muito sensível e específico, de fácil padronização e execução e possibilita automação; entretanto, tem um custo maior quando comparado ao método em tubo e necessita de equipamentos específicos. Por tais razões, esse método ainda não é utilizado na rotina da maioria dos laboratórios de análises clínicas do Brasil.

ENSAIO DE ADERÊNCIA DE ERITRÓCITOS EM FASE SÓLIDA

Essa tecnologia utiliza antígeno ou anticorpo imobilizado sobre um suporte sólido (microplaca) que permite uma reação com um antígeno/anticorpo livre. O final da reação é determinado pelo uso de eritrócitos que podem ser células indicadoras ou fazer parte da reação antígeno-anticorpo. A tipagem sanguínea direta é realizada com microplacas sensibilizadas com antissoros

anti-A, anti-B e anti-D. Os eritrócitos-teste tratados com bromelina são adicionados e a microplaca é centrifugada. Os eritrócitos positivos para o antígeno (aglutinados) ficam espalhados na microcavidade, e os eritrócitos negativos formam um botão no fundo da microcavidade. No caso da prova reversa ABO, uma monocamada da membrana eritrocitária é fixada no fundo da microcavidade. O plasma-teste é adicionado e, após incubação e lavagem, os eritrócitos indicadores revestidos com anti-IgG são adicionados para visualizar a reação.

O ensaio de aderência de eritrócitos em fase sólida é mais sensível para detecção de anticorpos antieritrocitários de importância clínica que o método em tubo.

A Figura 14.22 mostra o princípio da tecnologia de fase sólida *Capture-R® Ready-Screen®* (Immucor) para a detecção de anticorpos antieritrocitários.

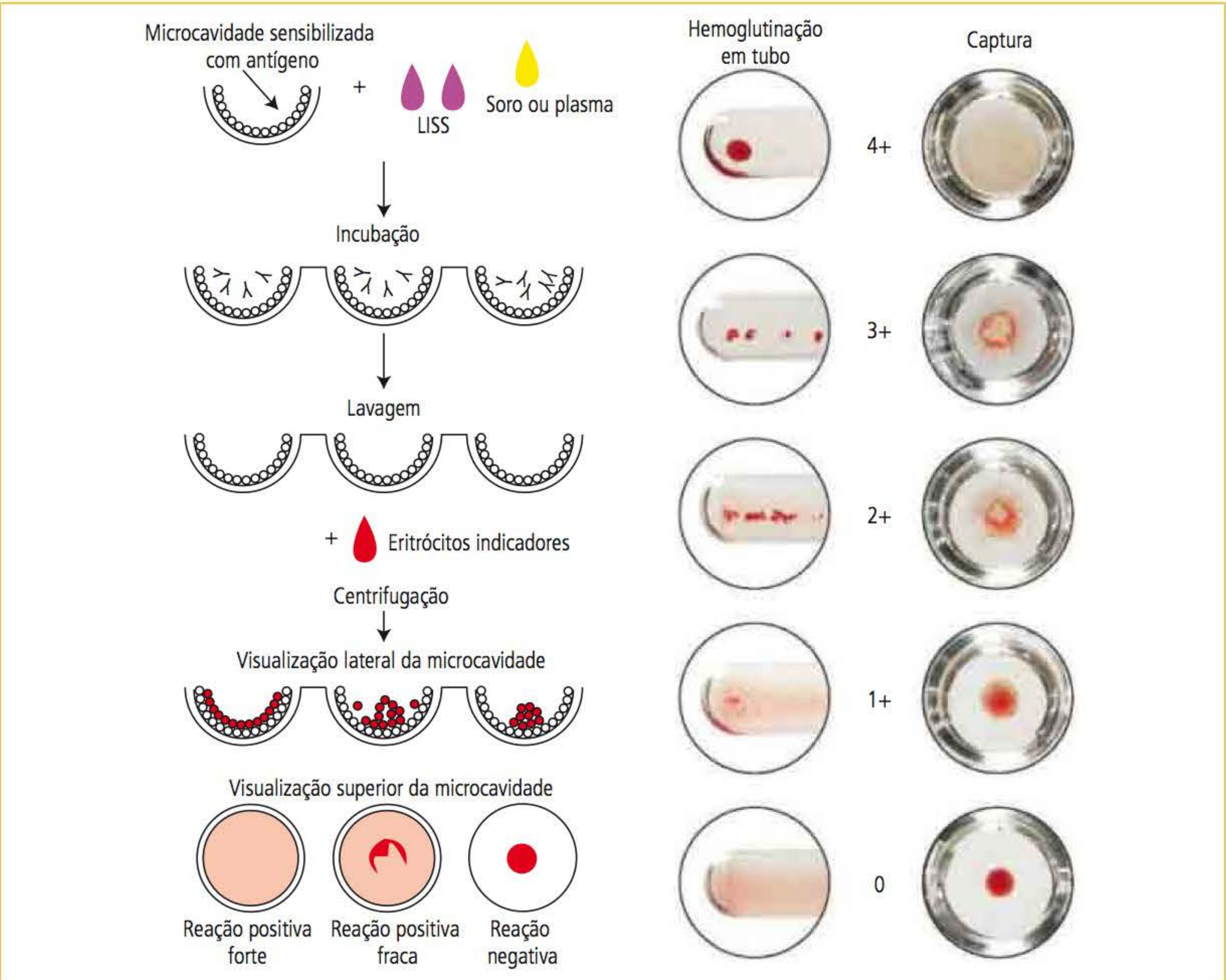


FIGURA 14.22 Tecnologia de fase sólida *Capture-R® Ready-Screen®* (Immucor).

LISS, solução salina de baixa força iônica.  
Fonte: Immucor.<sup>13</sup>



TECNOLOGIA DOS ERITRÓCITOS MAGNETIZADOS

Essa tecnologia (E.M.® Technology, Diagast®) utiliza eritrócitos magnetizados e uma placa magnética. As partículas magnéticas são fixadas na superfície eritrocitária por adsorção ou pela ligação entre anticorpos anti-GPA sensibilizados com partículas magnéticas e a glicoproteína GPA (glicoforina A). A tipagem sanguínea ABO e RhD é realizada em microplacas sensibilizadas com os antissoros. Os eritrócitos-teste, previamente tratados com solução magnetizadora e bromelina, são dispensados nas cavidades da microplaca. Após incubação, a microplaca é colocada sobre a placa magnética, que atrai os eritrócitos para o fundo das cavidades formando um botão, dispensando a centrifugação. Após agitação controlada, é realizada a leitura da reação: um botão de eritrócitos estável indica reação positiva, que pode ser quantificada em cruces (1 a 4+); na reação negativa, o botão de eritrócitos se desfaz e observa-se um aspecto homogêneo. A tecnologia dos eritrócitos magnetizados possibilita a automação e pode ser utilizada para a detecção de anticorpos antieritrocitários. A Figura 14.23 mostra a interpretação dos resultados de tipagem sanguínea e a pesquisa de anticorpos antieritrocitários utilizando a tecnologia dos eritrócitos magnetizados.

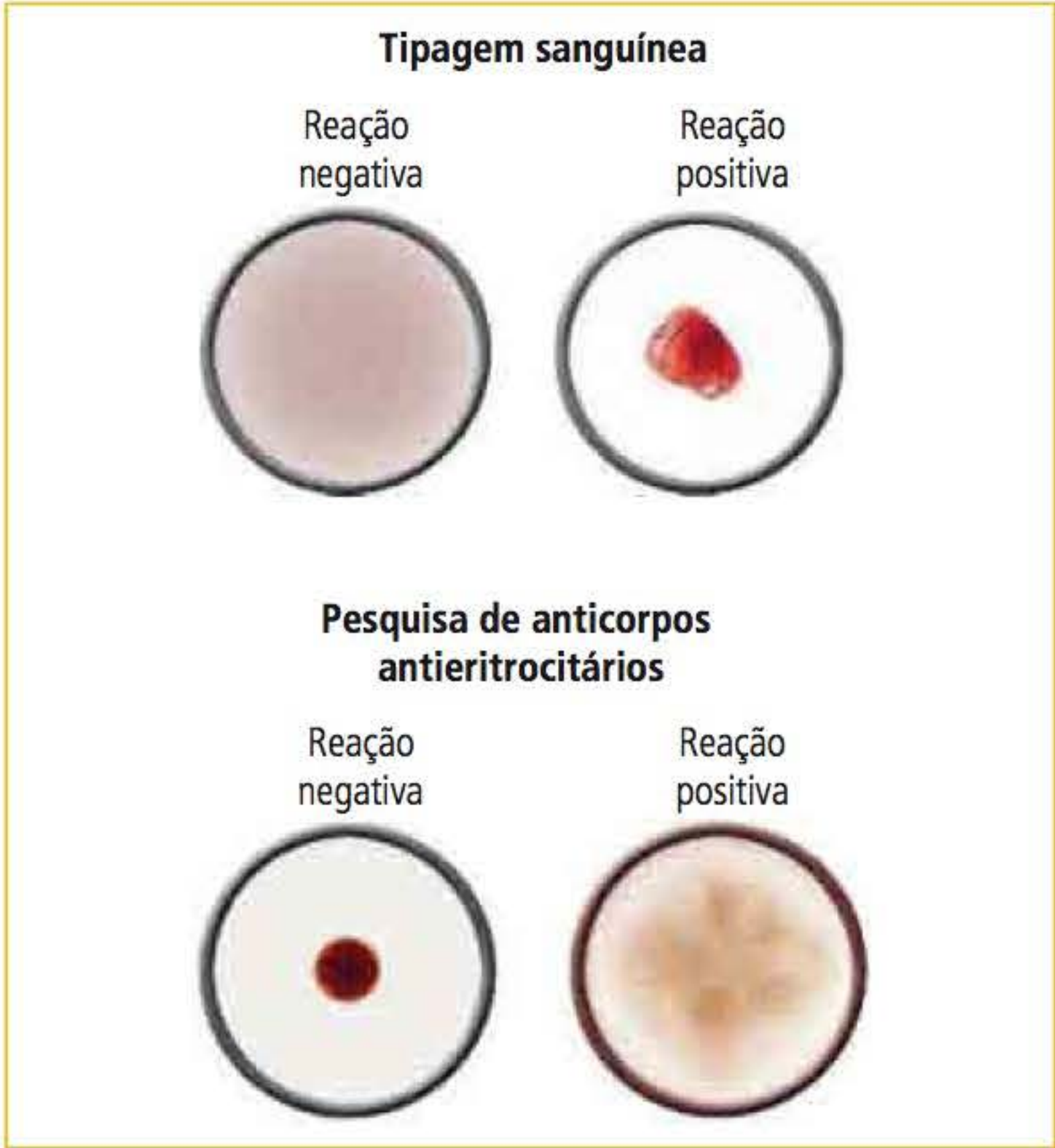


FIGURA 14.23 Interpretação do resultado de tipagem sanguínea e pesquisa de anticorpos antieritrocitários utilizando a tecnologia dos eritrócitos (Diagast®).

CONTROLE DE QUALIDADE EM IMUNO-HEMATOLOGIA

O controle de qualidade (CQ) é um processo utilizado para garantir a conformidade dos sistemas operacionais, das técnicas e dos equipamentos em busca da segurança e da qualidade necessárias. A implementação do controle de qualidade em imuno-hematologia é tão fundamental quanto em todas as áreas do laboratório. Erros frequentes são não ler a bula do reagente periodicamente para avaliar possíveis alterações no procedimento, a utilização de centrífugas não calibradas e erros de leitura, interpretação e registro dos resultados.

O CQ em imuno-hematologia pode ser classificado em externo e interno. O CQ externo permite avaliar a proficiência dos laboratórios. No Brasil, existem programas específicos para o CQ externo em imuno-hematologia, como o disponibilizado pela Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ABHH).<sup>14</sup>

O CQ interno é utilizado para determinar se a prática laboratorial está sendo realizada dentro de condições pré-estabelecidas. Os reagentes utilizados na imuno-hematologia devem ser avaliados a cada lote e diariamente para verificar se apresentam as especificações mínimas para o uso e avaliar as condições de transporte e armazenamento.

CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO A CADA LOTE

Quando o laboratório recebe um novo lote de reagentes, os itens a serem inspecionados são informações do rótulo, das instruções de uso e da embalagem/frasco, a intensidade da aglutinação, o título, a avidéz e a especificidade dos reagentes. O Quadro 14.1 mostra

QUADRO 14.1 Inspeção do rótulo, das instruções de uso e da embalagem	
PARÂMETRO	ESPECIFICAÇÕES
Avaliação do rótulo	Nome do fabricante, nome e origem do produto, data de validade, número do lote, volume, temperatura de estocagem, número de registro na Anvisa. O rótulo deve estar firmemente afixado ao frasco e permitir a inspeção visual do conteúdo
Avaliação das instruções de uso	Nome e composição do reagente, descrição dos procedimentos técnicos, informações claras, legíveis e em português
Avaliação da embalagem/frasco	Embalagem íntegra e bem-vedada e frascos conta-gotas transparentes

Nota: O clone dos antissoros monoclonais deve estar descrito na bula.  
Fonte: Brasil.<sup>15</sup>



as especificações para o controle de qualidade do rótulo, das instruções de uso do fabricante e da embalagem.

Para inspeção dos reagentes, devem ser determinadas sua especificidade e potência. A especificidade é a característica inerente ao anticorpo em reconhecer apenas antígenos eritrocitários complementares. A **Tabela 14.6** mostra a especificidade dos reagentes utilizados na imuno-hematologia.

A potência caracteriza a força do anticorpo e é medida pelos testes de avides, intensidade da aglutinação (reatividade), titulação e escore. A avides do anticorpo é determinada pelo grau e pela velocidade com que o anticorpo é capaz de aglutinar,

reagir ou se unir ao antígeno. O teste é realizado em lâmina com eritrócitos em suspensão a 10 a 20% (anti-A, anti-B) e 40 a 50% (anti-D) com auxílio de um aglutinoscópio. O título do anticorpo é obtido por meio de diluições seriadas do antissoro (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, até 1:512 ou mais). O título corresponde a maior diluição com uma reação de aglutinação  $\geq 1+$ . A intensidade da aglutinação (reatividade) e o escore foram descritos em Graduação da reação da aglutinação e escore numérico.

A **Tabela 14.7** demonstra as características satisfatórias dos reagentes mais utilizados no laboratório. Como exemplo, um soro anti-A, para ser

TABELA 14.6 Especificidade dos reagentes utilizados na imuno-hematologia		
REAGENTE	ESPECIFICAÇÃO	INTERPRETAÇÃO
Anti-A	Testar com eritrócitos O (3-5%)	Não deverá ocorrer aglutinação eritrocitária
Anti-B		
Anti-D	Testar com eritrócitos O RhD negativo (3-5%)	
Eritrócitos A1	Testar com plasma AB	
Eritrócitos B		
Antiglobulina humana (AGH)	Testar com três eritrócitos (3-5%) distintas não sensibilizadas pelo teste da antiglobulina direto (Coombs direto)	Não deverá ocorrer aglutinação eritrocitária ou hemólise

Fonte: Adaptada de Brasil.<sup>15</sup>

TABELA 14.7 Características satisfatórias para os antissoros anti-A, -B, -D, eritrócitos A <sub>1</sub> /B e para a antiglobulina humana (soro de Coombs)					
REAGENTE	ERITRÓCITOS/PLASMA	AVIDEZ (SEGUNDOS)	REATIVIDADE	TÍTULO	ESCORE
Anti-A	A <sub>1</sub>	Até 15	3+	256	72
	A <sub>1</sub> B	Até 30	3+	128	60
	A <sub>2</sub>	Até 30	2+	128	60
	A <sub>2</sub> B	Até 45	2+	64	52
Anti-B	B A <sub>1</sub> B	Até 15	3+	256	72
Anti-D	O R <sub>0</sub> r (Dce/ce) O R <sub>1</sub> r (DCe/ce) O R <sub>2</sub> r (DcE/ce)	Até 30	3+	32	-
Eritrócitos A <sub>1</sub>	plasma B	-	2+	-	-
Eritrócitos B	plasma A	-	2+	-	-
Antiglobulina humana monoespecífica e poliespecífica	O R <sub>0</sub> r (Dce/ce) sensibilizada com IgG anti-D	-	3+ Teste da antiglobulina direto	128	-

**Nota:** Recomenda-se utilizar três eritrócitos para cada fenótipo. Avides para anti-A e anti-B: utilizar eritrócitos 10-20%. Avides para anti-D: utilizar eritrócitos 40-50%. Título e a reatividade: utilizar eritrócitos 3-5%.

Fonte: Adaptada de Brasil<sup>15</sup> e Novaretti e colaboradores.<sup>16</sup>



aprovado no laboratório, deve apresentar um título mínimo de 256 com eritrócitos A<sub>1</sub>, uma avidéz de até 15 segundos e reatividade de 3+. Caso não atenda uma dessas características, o lote deve ser rejeitado. Para o laboratório de análises clínicas, a dificuldade na realização do controle de qualidade dos antissoros e da antiglobulina humana é a obtenção de eritrócitos fenotipados (R<sub>0</sub>r, R<sub>1</sub>r, R<sub>2</sub>r). Uma estratégia seria recorrer a um hemocentro que realiza fenotipagem eritrocitária.

CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO DIÁRIO

Os reagentes utilizados na rotina devem ser inspecionados diariamente. Os antissoros não devem apresentar precipitados, partículas, fungos ou turvação. As hemácias reagentes não devem apresentar hemólise, turvação do líquido sobrenadante ou escurecimento. O controle de qualidade diário deve ser realizado utilizando controles negativos e positivos. A **Tabela 14.8** demonstra um exemplo de controle de qualidade diário em imuno-hematologia.

CONTROLE DE QUALIDADE DE EQUIPAMENTOS

O controle de qualidade dos equipamentos utilizados na imuno-hematologia deve ser realizado

periodicamente e após manutenção. Deve ser avaliado o funcionamento do *freezer*, refrigerador, banho-maria e centrífuga sorológica.

A centrifugação é utilizada para intensificar a hemaglutinação *in vitro*. A força da centrifugação deve ser suficiente para formar um botão bem-delineado, permitir a ressuspensão dos eritrócitos ao agitar suavemente o tubo e provocar a aglutinação eritrocitária específica. A calibração da centrífuga avalia o comportamento dos eritrócitos em soluções de diferentes viscosidades (ver Métodos laboratoriais, métodos 11 e 12 [**Quadros 14.12** e **14.13**]).

LEITURA, INTERPRETAÇÃO E REGISTRO DOS RESULTADOS

A execução dos testes deve ser criteriosa e, para aumentar a segurança, os testes devem ser confirmados por outro técnico (conferência dupla). É importante registrar em uma planilha de trabalho a leitura e a interpretação dos resultados, o nome do fabricante, o lote, a validade e o clone do reagente utilizado. A **Tabela 14.9** mostra um exemplo de planilha de trabalho em imuno-hematologia.

MÉTODOS LABORATORIAIS

Os **Quadros 14.2** a **14.13** apresentam os métodos laboratoriais em imuno-hematologia.

TABELA 14.8 Exemplo de controle de qualidade diário dos reagentes utilizados na imuno-hematologia			
REAGENTE	ERITRÓCITOS/SORO OU PLASMA	FREQUÊNCIA	TÉCNICA
Anti-A	Uma amostra de eritrócitos de cada um dos grupos: O, A <sub>1</sub> , B	A cada bateria de testes ou pelo menos 1 vez ao dia	Aglutinação direta
Anti-B			
Anti-D	Uma amostra de eritrócitos RhD positivo e uma RhD negativo		Aglutinação direta e pesquisa de D fraco*
Eritrócitos A <sub>1</sub>	Uma amostra de soro ou plasma de cada um dos grupos: O, A, B		Aglutinação direta
Eritrócitos B			
Antiglobulina humana monoespecífica e poliespecífica	Eritrócitos sensibilizados com IgG (controle de Coombs)	A cada teste da antiglobulina negativo	Teste da antiglobulina

**Nota:** \*Realizar o teste da antiglobulina indireto (Coombs indireto) para a pesquisa do D fraco, quando necessário.  
**Fonte:** Adaptada de Council of Europe.<sup>17</sup>



TABELA 14.9 Exemplo de planilha de trabalho de imuno-hematologia														
Nº	NOME DO PACIENTE	PROVA DIRETA ANTI-				PROVA REVERSA		TIPAGEM SANGUÍNEA	TAI		TAD		REALIZADO POR	CONFERIDO POR
		A	B	D	C	RA	RB		I	II	MONO	POLI		
1		4+	0	4+	0	0	4+	A RhD POS	0	0	3+	3+		
2		0	0	0	0	4+	4+	O RhD NEG	3+	3+	0	0		
3		4+	4+	4+	4+	4+	4+	Inconclusiva	4+	4+	4+	4+		
4		0	4+	0	0	3+	0	B RhD NEG	0	0	0	0		
5		1+	4+	2+	0	0	0	AB RhD POS	2+	0	0	0		
Reagente						Fabricante			Lote		Validade		Clone	
Anti-A (A)														
Anti-B (B)														
Anti-D (D)														
Controle de Rh (C)														
Eritrócitos A <sub>1</sub> (RA)														
Eritrócitos B (RB)														
Eritrócitos I e II														
Eritrócitos-controle de Coombs (sensibilizados com IgG)														
Antiglobulina monoespecífica														
Antiglobulina poliespecífica														

TAI, teste da antiglobulina indireto (Coombs indireto); TAD, teste da antiglobulina direto (Coombs direto); Mono, soro de Coombs monoespecífico (anti-IgG); Poli, soro de Coombs poliespecífico ou anti-humano (anti-IgG+anti-C3d); 0, ausência de aglutinação; ±, aglutinação pouco visível, fundo avermelhado; 1+, aglutinados pequenos, fundo róseo; 2+, aglutinados de tamanho médio, fundo claro; 3+, vários aglutinados grandes; 4+, um aglutinado sólido.

**Fonte:** American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.2 Método 1 – Técnica de tipagem sanguínea ABO e RhD em tubo																					
	Reagentes: anti-A, anti-B, anti-AB (opcional), anti-D, controle de Rh, eritrócitos A <sub>1</sub> , eritrócitos B, solução salina (NaCl 0,9%)																				
1	Amostra: coletar 2 a 5 mL de sangue venoso periférico com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético [EDTA, do inglês <i>ethylenediamine tetracetic acid</i> ]) e centrifugar na velocidade e no tempo padronizados																				
2	Identificar sete tubos de ensaio 12x75 mm com o número da amostra e como A, B, D, C, 3%, RA, RB																				
3	Dispensar 1,5mL de solução salina no tubo 3%																				
4	Dispensar uma gota (50 µL) dos reagentes:																				
	<table><tr><td></td><td>Tubo</td><td>Reagente</td></tr><tr><td rowspan="5">Prova direta</td><td rowspan="2">{ A</td><td>Anti-A</td></tr><tr><td>B</td><td>Anti-B</td></tr><tr><td>D</td><td>Anti-D<sup>3</sup></td></tr><tr><td>C</td><td>Controle de Rh<sup>3</sup></td></tr><tr><td>3%</td><td>Não dispensar reagente: tubo com solução salina</td></tr><tr><td rowspan="2">Prova reversa</td><td rowspan="2">{ RA</td><td>Eritrócitos A1</td></tr><tr><td>RB</td><td>Eritrócitos B</td></tr></table>		Tubo	Reagente	Prova direta	{ A	Anti-A	B	Anti-B	D	Anti-D <sup>3</sup>	C	Controle de Rh <sup>3</sup>	3%	Não dispensar reagente: tubo com solução salina	Prova reversa	{ RA	Eritrócitos A1	RB	Eritrócitos B	
	Tubo	Reagente																			
Prova direta	{ A	Anti-A																			
		B	Anti-B																		
	D	Anti-D <sup>3</sup>																			
	C	Controle de Rh <sup>3</sup>																			
	3%	Não dispensar reagente: tubo com solução salina																			
Prova reversa	{ RA	Eritrócitos A1																			
		RB	Eritrócitos B																		
5	Com auxílio de pipeta de Pasteur, aspirar o plasma a ser testado e dispensar duas gotas (100 µL) em cada um dos tubos RA e RB																				
6	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Preparar suspensão de eritrócitos-teste 3%</li><li>▪ Com a mesma pipeta de Pasteur, pipetar pequeno volume dos eritrócitos-teste e dispensar uma gota (50 µL) no tubo 3%; homogeneizar a suspensão de eritrócitos</li></ul>																				
7	Dispensar 1 gota de eritrócitos-teste a 3% em cada um dos tubos A, B, D e C.																				
8	Homogeneizar todos os tubos																				
9	Centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado																				
10	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, graduar, registrar e interpretar os resultados. Recomenda-se a conferência da leitura por outro técnico (conferência dupla)																				

- Interpretação dos resultados:
- aglutinação ou hemólise: reação positiva
  - ausência de aglutinação no tubo D: pesquisar D fraco
  - controle de Rh: não deve aglutinar. Se aglutinar, o resultado é inválido

**Notas:**

- A técnica deve ser realizada de acordo com instruções do fabricante.
- Tubos de ensaio 12x75mm: podem ser utilizados tubos de vidro ou de poliestireno descartável (tubo transparente). A lavagem de tubos é etapa crítica, pois resíduos (p. ex., detergente) podem causar aglutinação inespecífica.
- O anti-D pode ser policlonal, monoclonal (mAb) IgM, mAb IgG ou mistura de mAb IgG+IgM (*Blend*). O clone do anti-D monoclonal deve estar especificado na bula. O controle de Rh deve ser da mesma marca/fabricante que o anti-D. Para anti-D produzido em meio salino o controle de Rh é dispensável.

**Recomendações:**

Portaria 2712/2013 – Anvisa<sup>15</sup> para receptores de sangue (pacientes), recomenda-se utilizar dois anti-D mAb (1 DVI+ e 1 DVI-), quando houver discrepância deve-se investigar D fraco e D parcial; para doadores de sangue, recomenda-se utilizar dois anti-D mAb, sendo pelo menos um anti-D IgG e realizar a fase da antiglobulina humana – AGH (fase de Coombs).

**British Committee for Standards in Haematology:**<sup>18,19</sup> recomenda dois anti-D mAb IgM potentes e não realizar pesquisa de D fraco em pacientes.

- Suspensão de eritrócitos aproximadamente a 3% (pode variar de 2-5%).
- Proceder à centrifugação de acordo com recomendações do fabricante; a centrífuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.
- Graduação da reação: ver Graduação da reação e escore numérico.
- Reação discrepante entre a prova direta e a prova reversa ou reação fraca: pesquisar a presença de autoanticorpos ou aloanticorpos frios, formação de *rouleaux*, realizar técnica com incubação a 4 °C.
- Controle de Rh reagente (positivo): invalida o resultado de tipagem RhD. Pesquisar a formação de *rouleaux*, realizar o teste da antiglobulina direto. Se positivo, repetir tipagem sanguínea após dissociação de anticorpos IgG dos eritrócitos pela técnica da cloroquina seguida da técnica de bloqueio (ver métodos 9 e 10).

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.3 Método 2 – Pesquisa do antígeno D fraco pelo método em tubo	
	Reagentes: anti-D, solução salina (NaCl 0,9%), soro de Coombs monoespecífico (anti-IgG), eritrócitos-controle sensibilizadas com IgG.
1	Realizar a pesquisa do D fraco se for observada <b>ausência de aglutinação no tubo D (método 1)</b>
2	Incubar os tubos D e C por <b>15 minutos a 37 °C</b> ou de acordo com as instruções do fabricante
3	Centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado <sup>3</sup>
4	Agitar suavemente os tubos para ressuspender os eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, registrar e interpretar os resultados
5	<b>Interpretação:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>aglutinação após incubação a 37 °C:</b> considerar RhD positivo</li><li>▪ <b>ausência de aglutinação:</b> continuar o teste</li></ul>
6	Lavar três vezes os tubos D e C com solução salina. Centrifugar os tubos por 1 minuto a 3.400 rpm ou conforme padronizado
7	Após a última lavagem, decantar toda a salina em papel absorvente
8	Adicionar duas gotas de soro de Coombs monoespecífico e homogeneizar
9	Centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado
10	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e observar a aglutinação e/ou hemólise. Graduar, registrar e interpretar os resultados. Recomenda-se a conferência da leitura por outro técnico (conferência dupla)
11	<b>Interpretação:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>ausência de aglutinação tubo D:</b> RhD negativo</li><li>▪ <b>aglutinação do tubo D:</b> RhD positivo (D fraco)</li><li>▪ <b>controle de Rh negativo:</b> teste validado</li><li>▪ <b>controle de Rh positivo:</b> resultado de RhD inconclusivo; resolver a discrepância</li></ul>
12	Ausência de aglutinação no tubo D e/ou C: adicionar uma gota do controle de Coombs (eritrócitos sensibilizados) e centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm. Agitar suavemente os tubos e observar a aglutinação
13	O controle de Coombs deve aglutinar (reação positiva) para validar as lavagens em solução salina e validar o soro de Coombs. O controle de Coombs negativo invalida o resultado do teste de Coombs (repetir o teste)

**Notas:**

1. A técnica deve ser realizada de acordo com instruções do fabricante.

2. O anti-D pode ser policlonal, monoclonal (mAb) IgM, mAb IgG ou mistura de mAb IgG+IgM (*blend*). O clone do anti-D monoclonal deve estar especificado na bula.

Recomendações:

**Portaria 2712/2013 – ANVISA:**<sup>15</sup> para receptores de sangue (pacientes), recomenda-se utilizar dois anti-D mAb (1 DVI+ e 1 DVI-), quando houver discrepância deve-se investigar D fraco e D parcial; para doadores de sangue, recomenda-se utilizar dois anti-D mAb, sendo pelo menos um anti-D IgG e realizar a fase da antiglobulina humana – AGH (fase de Coombs).

**British Committee for Standards in Haematology:**<sup>18,19</sup> recomenda dois anti-D mAb IgM potentes e não realizar pesquisa de D fraco em pacientes.

**American Association of Blood Banks:**<sup>2</sup> recomenda não realizar pesquisa de D fraco em amostras de pacientes.

3. Proceder à centrifugação como recomendado pelo fabricante; a centrífuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.

4. Quando utilizado anti-D VI+ (p. ex., clones MS-26, ESD-1), com reação de aglutinação < 2+, alguns autores recomendam considerar o paciente como RhD negativo para fins de transfusão sanguínea ou imunoprofilaxia Rh.

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.4 Método 3 – Teste da antiglobulina indireto-TAI (Coombs indireto) pelo método em tubo com polietilenoglicol	
	<b>Reagentes:</b> hemácias reagentes fenotipados, soro de Coombs monoespecífico(anti-IgG), aditivo polietilenoglicol (PEG), solução salina (NaCl 0,9%), eritrócitos-controle sensibilizados com IgG
1	Identificar dois tubos de ensaio 12x75mm como I e II
2	Pipetar uma gota de hemácias reagentes fenotipados I e II nos respectivos tubos
3	Pipetar duas gotas (100 µL) de soro ou plasma <sup>3</sup> com pipeta de Pasteur em cada um dos tubos
4	Homogeneizar os tubos e centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm
5	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, registrar e interpretar os resultados
6	Ler e interpretar os resultados: ▪ <b>aglutinação:</b> presença de anticorpo frio (reagente à temperatura < 32 °C, ótimo de reatividade a 4 °C), identificar o anticorpo frio e continuar o teste para verificar a presença de anticorpos quentes (reagente a 37 °C) ▪ <b>ausência de aglutinação:</b> continuar o teste
7	Adicionar duas gotas de PEG em cada um dos tubos
8	NÃO CENTRIFUGAR
9	Incubar os tubos I e II por 15 minutos a 37 °C
10	NÃO CENTRIFUGAR
11	Lavar os tubos I e II por quatro vezes com solução salina. Centrifugar os tubos por 1 minuto a 3.400 rpm ou conforme padronizado
12	Após a última lavagem, decantar toda a salina em papel absorvente
13	Adicionar duas gotas do soro de Coombs <b>monoespecífico</b> e homogeneizar
14	Centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado
15	Agitar suavemente os tubos para ressuspender os eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, graduar, registrar e interpretar os resultados.
16	<b>Interpretação:</b> ▪ <b>aglutinação em qualquer um dos tubos (I e/ou II):</b> reagente. Presença de anticorpo IgG. Identificar o anticorpo ▪ <b>ausência de aglutinação nos tubos I e II:</b> não reagente
17	Tubos que não aglutinaram: adicionar uma gota do controle de Coombs (eritrócitos sensibilizados) e centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm. Homogeneizar suavemente os tubos e observar a aglutinação
18	O controle de Coombs deve aglutinar (reação positiva) para validar as lavagens em solução salina e validar o soro de Coombs. O controle de Coombs negativo invalida o resultado do teste de Coombs (repetir o teste)

**Notas:**

1. Técnica de acordo com instruções do reagente Bio Peg – BSA/Fresenius-Kabi®. O PEG é mais sensível que a albumina bovina. Se for utilizada albumina bovina, ver instruções do fabricante.

2. Amostra: soro ou plasma. Teoricamente, o plasma teria desvantagem pela ação do anticoagulante que inibe a ativação do complemento e não seriam detectados anticorpos que ativam complemento (p. ex., anti-Vel). Por outro lado, o plasma é mais conveniente na automação dos testes.

3. Hemácias reagentes: O teste da antiglobulina indireto não deve ser realizado com *pool* de eritrócitos O RhD positivo, pois detectaria somente anti-D e não os demais anticorpos clinicamente significantes. Recomenda-se utilizar eritrócitos de doador R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (DcE/DcE) e R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (DcE/DcE) que expressem os antígenos C, c, D, E, e, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s, M, N, Le<sup>a</sup>, Di<sup>a</sup>. Os antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s devem estar expressos em homozigose para evitar falso-negativo por efeito de dose (quando expresso em heterozigose).

4. A centrifuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.

5. A centrifugação deve ser omitida nesta etapa porque os eritrócitos podem formar agregados e dificultar a interpretação dos resultados.

6. Usar soro de Coombs monoespecífico porque alguns soros de Coombs poliespecíficos podem causar reações falso-positivas.

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.5 Método 4 – Teste da antiglobulina indireto-TAI (Coombs indireto) com amostra pré-aquecida a 37 °C	
	<b>Reagentes:</b> hemácias reagentes fenotipados, soro de Coombs monoespecífico (anti-IgG), solução salina (NaCl 0,9%) aquecida a 37 °C, eritrócitos-controle sensibilizados com IgG
1	Identificar dois tubos de ensaio 12x75mm como I e II
2	Pipetar uma gota de hemácias reagentes fenotipados I e II nos respectivos tubos
3	Pipetar o soro ou plasma em tubo de ensaio 12x75 com volume suficiente para realizar o TAI
4	Incubar a pipeta de Pasteur (ou ponteira), os tubos I e II e o tubo contendo soro ou plasma separadamente por 15 minutos a 37 °C
5	Pipetar duas gotas do soro ou plasma pré-aquecido nos tubos I e II, homogeneizar e incubar por 60 minutos a 37 °C. Incubar a salina a 37 °C para lavagem
6	Lavar os tubos por 3 a 4 vezes com salina aquecida a 37 °C
7	Adicionar duas gotas do soro de Coombs monoespecífico, homogeneizar e centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou de acordo com o padronizado
8	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, graduar, registrar e interpretar os resultados
9	<b>Ler e interpretar os resultados:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>aglutinação:</b> presença de anticorpo quente (reagente a 37 °C). Realizar a identificação do anticorpo antieritrocitário com técnica pré-aquecida para avaliar a importância clínica</li><li>▪ <b>ausência de aglutinação:</b> não reagente</li></ul>
10	Tubos que não aglutinaram: adicionar uma gota do controle de Coombs (eritrócitos sensibilizados) e centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm. Homogeneizar suavemente os tubos e observar a aglutinação
11	O controle de Coombs deve aglutinar (reação positiva) para validar as lavagens em solução salina e validar o soro de Coombs. O controle de Coombs negativo invalida o resultado do teste de Coombs (repetir o teste)

**Notas:**

1. O pré-aquecimento da amostra pode ser útil na pesquisa e identificação de anticorpos reativos a 37°C, em especial na presença de alo ou autoanticorpos reativos a frio, que poderiam mascarar a presença de anticorpos clinicamente significantes.

2. Esta técnica deve ser utilizada com cautela, pois pode reduzir a sensibilidade de detecção de alguns anticorpos clinicamente significantes. Se o teste for positivo, realizar a identificação de anticorpos com pré-aquecimento.

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.6 Método 5 – Teste da antiglobulina direto-TAD (Coombs direto) pelo método em tubo	
	<b>Reagentes:</b> soro de Coombs monoespecífico (anti-IgG) e soro de Coombs poliespecífico ou anti-humano (anti-IgG + anti-C3d), solução salina (NaCl 0,9%), tubo com EDTA para coleta da amostra
1	Identificar quatro tubos de ensaio 12x75mm como 3%, M, P e C (controle negativo)
2	Dispensar <b>1,5mL</b> de solução salina no tubo <b>3%</b>
3	<b>Preparar suspensão de eritrócitos-teste 3% (coletados em tubo com EDTA)</b> Com uma pipeta de Pasteur, pipetar pequeno volume dos eritrócitos-teste e dispensar uma gota (50 µL) no <b>tubo 3%</b> ; homogeneizar a suspensão de eritrócitos
4	Dispensar duas gotas da suspensão de eritrócitos a 3% em cada um dos tubos M, P e C
5	Lavar os tubos M e P por três vezes com solução salina (sangue de cordão: lavar de 6 - 8 vezes). Centrifugar os tubos por 1 minuto a 3.400 rpm ou conforme padronizado <sup>2</sup>
6	Após a última lavagem, decantar toda a salina em papel absorvente
7	Adicionar duas gotas do soro de Coombs monoespecífico no tubo M e duas gotas do soro de Coombs poliespecífico nos tubos P e C. Homogeneizar
7	Centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado
8	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, graduar, registrar e interpretar os resultados
9	<b>Interpretação:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>aglutinação no tubo M:</b> reagente. Presença de anticorpo IgG no eritrócito-teste</li><li>▪ <b>aglutinação no tubo P:</b> reagente. Presença de anticorpo IgG e/ou C3d</li><li>▪ <b>ausência de aglutinação nos tubos M e P:</b> não reagente</li><li>▪ <b>aglutinação no tubo C:</b> resultado inconclusivo, possível presença de aglutininas frias (repetir teste com solução salina aquecida a 37 °C)</li></ul>
10	Tubo P não reagente: incubar por cinco minutos à temperatura ambiente (anti-C3d necessita de incubação para reagir) Centrifugar novamente por 1 minuto a 1.000 rpm. Agitar suavemente o tubo e observar a aglutinação. <b>Aglutinação:</b> reagente (possível C3d depositado na membrana eritrocitária, confirmar com anti-C3d monoespecífico)
11	Tubos que não aglutinaram: adicionar uma gota do controle de Coombs (eritrócitos sensibilizados) e centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm. Agitar suavemente os tubos e observar a aglutinação
12	O controle de Coombs deve aglutinar (reação positiva) para validar as lavagens em solução salina e validar o soro de Coombs. O controle de Coombs negativo invalida o resultado do teste (repetir)

**Notas:**

1. A técnica deve ser realizada de acordo com instruções do fabricante.
2. Suspensão de eritrócitos aproximadamente a 3% (pode variar de 2-5%). Utilizar amostra coletada com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Amostra coagulada pode ativar proteínas do complemento *in vitro*, causando um resultado falso-positivo.
3. A centrífuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.
4. Realizar a incubação com soro de Coombs poliespecífico de acordo com instruções do fabricante.

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.7 Método 6 – Detecção de antígenos ABO fracos e anticorpos por incubação à temperatura ambiente e a 4 °C	
	<b>Reagentes:</b> anti-A, anti-B, anti-AB (opcional), eritrócitos A <sub>1</sub> (RA),eritrócitos B (RB), eritrócitos O (O), albumina bovina a 6% (ALB 6%). ALB 6%: diluir 1,4 mL de albumina bovina 22% em 4 mL de salina (NaCl 0,9%)
1	Realizar o procedimento de acordo com o método 1 para tipagem sanguínea ABO (prova direta e reversa) ▪ <b>Tubo-controle da prova direta:</b> ALB (eritrócitos do paciente a 3% + albumina bovina a 6%) ▪ <b>Tubo-controle da prova reversa:</b> O (eritrócitos O + soro/plasma do paciente)
2	Incubar os tubos A, B, ALB, RA, RB e O por 30 minutos à temperatura ambiente (20-24 °C)
3	Centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado
4	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, registrar e interpretar os resultados
5	Interpretação dos resultados: ▪ <b>aglutinação ou hemólise:</b> reação positiva ▪ <b>ausência de aglutinação:</b> incubar os tubos por 30 minutos a 4 °C (2-8 °C)
6	Centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado
7	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, graduar, registrar e interpretar os resultados
8	Interpretação dos resultados: ▪ <b>aglutinação ou hemólise:</b> reação positiva ▪ <b>ausência de aglutinação:</b> reação negativa ▪ <b>aglutinação no tubo com albumina bovina 6%:</b> resultado inconclusivo, aglutinação espontânea ▪ <b>aglutinação no tubo O:</b> resultado inconclusivo, investigar presença de autoanticorpo ou aloanticorpo

- Notas:**
- 1. A pesquisa de subgrupos de A fracos pode ser realizada pela técnica de adsorção-eluição.
  - 2. A centrífuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.8 Método 7 – Titulação de anticorpos antieritrocitários																																																																																			
	<b>Reagentes:</b> soro de Coombs monoespecífico (anti-IgG), eritrócitos do grupo O a 2% contendo o antígeno específico, eritrócitos-controle sensibilizados com IgG, solução salina (NaCl 0,9%)																																																																																		
1	Preparar a suspensão de eritrócitos do grupo O a 2%: pipetar 2,45 mL de salina e adicionar 50 µL dos eritrócitos. Homogeneizar bem																																																																																		
2	Realizar diluições seriadas do soro: identificar 11 tubos de ensaio 2 (1:2), 4, 8, 16, 32 até 2.048. Pipetar 500 µL de salina nos tubos. Pipetar 500 µL do soro não diluído no tubo 2, homogeneizar bem. Pipetar 500 µL do tubo 2 e dispensar no tubo 4, homogeneizar bem. Repetir esse procedimento até o tubo 2.048																																																																																		
3	Identificar 12 tubos de ensaio: 1, 2, 4, 8, 16, 32 até 2.048. Pipetar 100 µL do soro não diluído no tubo 1. Pipetar 100 µL da diluição 2 (1:2) no tubo 2, 100 µL da diluição 4 (1:4) no tubo 4 e assim sucessivamente																																																																																		
4	Adicionar 100 µL da suspensão de eritrócitos a 2% em todos os tubos. Podem ser utilizados eritrócitos comerciais de 3 a 4%, embora isso diminua a precisão do teste																																																																																		
5	Homogeneizar os tubos e incubar por 1 hora a 37 °C																																																																																		
6	Lavar os tubos quatro vezes com salina. Após a última lavagem, decantar toda a salina em papel absorvente																																																																																		
7	Adicionar duas gotas do soro de Coombs monoespecífico em cada um dos tubos																																																																																		
8	Homogeneizar e centrifugar por 1 minuto a 1000 rpm ou conforme padronizado																																																																																		
9	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação ou hemólise. Ler os tubos em espelho ou fundo branco, graduar, registrar e interpretar os resultados																																																																																		
10	<div>Interpretação dos resultados:</div> <div><div>▪ <b>aglutinação:</b> reação positiva</div><div>▪ <b>título:</b> maior diluição que apresentar aglutinação com graduação ≥ 1+. Por exemplo: diluição 1:32, título = 32. A tabela abaixo demonstra o título e escore de duas amostras</div></div> <table><tr><th rowspan="2">Amostra</th><th colspan="10">Diluição do soro</th><th rowspan="2">Título</th><th rowspan="2">Escore</th></tr><tr><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>8</th><th>16</th><th>32</th><th>64</th><th>128</th><th>256</th><th>512</th></tr><tr><td>1 graduação</td><td>4+</td><td>3+</td><td>3+</td><td>2+</td><td>2+</td><td>2+</td><td>1+</td><td>±</td><td>±</td><td>0</td><td rowspan="2">64</td><td rowspan="2">65</td></tr><tr><td>1 escore</td><td>12</td><td>10</td><td>10</td><td>8</td><td>8</td><td>8</td><td>5</td><td>2</td><td>2</td><td>0</td></tr><tr><td>2 graduação</td><td>2+</td><td>1+</td><td>1+</td><td>1+</td><td>±</td><td>±</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td rowspan="2">8</td><td rowspan="2">27</td></tr><tr><td>2 escore</td><td>8</td><td>5</td><td>5</td><td>5</td><td>2</td><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr></table>												Amostra	Diluição do soro										Título	Escore	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 graduação	4+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	±	±	0	64	65	1 escore	12	10	10	8	8	8	5	2	2	0	2 graduação	2+	1+	1+	1+	±	±	0	0	0	0	8	27	2 escore	8	5	5	5	2	2	0	0	0	0
Amostra	Diluição do soro										Título	Escore																																																																							
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512																																																																									
1 graduação	4+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	±	±	0	64	65																																																																							
1 escore	12	10	10	8	8	8	5	2	2	0																																																																									
2 graduação	2+	1+	1+	1+	±	±	0	0	0	0	8	27																																																																							
2 escore	8	5	5	5	2	2	0	0	0	0																																																																									
11	Tubos que não aglutinaram: adicionar uma gota do controle de Coombs (eritrócitos sensibilizados) e centrifugar por 1 minuto a 1.000 rpm. Agitar suavemente os tubos e observar a aglutinação																																																																																		
12	O controle de Coombs deve aglutinar (reação positiva) para validar as lavagens em solução salina e validar o soro de Coombs. O controle de Coombs negativo invalida o resultado do teste de Coombs (repetir o teste)																																																																																		

**Notas:**

1. A técnica deve ser realizada de acordo com instruções do fabricante.
2. Eritrócitos para titulação do anti-D: a seleção das eritrócitos é controversa. Alguns autores recomendam utilizar eritrócitos R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (DcE/DcE) por ter expressão mais forte do antígeno D e apresentar menor variação na expressão dos antígenos D na população. Outros autores recomendam a utilização do fenótipo R<sub>1</sub>r (DcE/cE) que expressa uma única dose do antígeno D. O importante é a padronização do teste. Se uma amostra for titulada com eritrócitos R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, esse fenótipo deve ser utilizado para uma titulação futura.
3. A centrífuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.
4. Para determinar o aumento de título do anticorpo antieritrocitário, a titulação deve ser realizada com duas amostras simultaneamente. Guardar a primeira amostra congelada até a realização do teste com a amostra subsequente. A variação de dois ou mais títulos entre duas amostras indica estímulo na produção de anticorpos.
5. A titulação é um método simples, mas é limitada por fornecer um resultado semiquantitativo, pela falta de acurácia e pela subjetividade da interpretação.

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.9 Método 8 – Investigação da formação de <i>rouleaux</i>	
	<b>Reagentes:</b> eritrócitos A <sub>1</sub> , eritrócitos B, eritrócitos O, salina (NaCl 0,9%)
1	Realizar o procedimento de acordo com o método 1 para tipagem sanguínea ABO (prova reversa: tubos A <sub>1</sub> , B, O)
2	Centrifugar os tubos A <sub>1</sub> , B e O por 1 minuto a 1.000 rpm ou conforme padronizado
3	Remover o soro (plasma), deixando os eritrócitos no tubo
4	Adicionar duas gotas de solução salina
5	Agitar suavemente os tubos para ressuspender o botão de eritrócitos e verificar a presença de aglutinação
6	Interpretação dos resultados: <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>rouleaux:</b> eritrócitos ressuspensos com solução salina</li><li>▪ <b>aglutinação específica:</b> eritrócitos permanecem aglutinados</li><li>▪ Se necessário, observar ao microscópio óptico</li></ul>

**Notas:**

1. A centrífuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.

2. *Rouleaux*: os eritrócitos estão empilhados como moedas (observar ao microscópio óptico). Investigar história de mieloma múltiplo, crioglobulinemia, cirrose e hiperfibrinogenemia causada por infecções.

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>

QUADRO 14.10 Método 9 – Dissociação de anticorpos IgG dos eritrócitos com TAD positivo pela cloroquina	
	<b>Reagentes:</b> eritrócitos-teste com TAD positivo, solução de difosfato de cloroquina a 20g/100 mL, soro de Coombs monoespecífico, salina (NaCl 0,9%)
1	Preparar a solução de difosfato de cloroquina: dissolver 20 g de difosfato de cloroquina em 100 mL de solução salina. Ajustar o pH para 5,1 com NaOH 1N e armazenar de 2 a 8 °C
2	Pipetar 10 gotas dos eritrócitos-teste em tubo de ensaio 12x75mm
3	Lavar os eritrócitos três vezes com solução salina
4	Pipetar 40 gotas de solução de difosfato de cloroquina, homogeneizar e incubar 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 24 °C)
5	Após 30 minutos de incubação, retirar uma pequena alíquota de eritrócitos-teste e lavar três vezes com solução salina. Centrifugar por 1 minuto a 3.400 prm ou conforme padronizado
6	Realizar o TAD (teste de Coombs direto)
7	<b>Interpretação:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>TAD negativo:</b> eritrócitos podem ser utilizados para tipagem sanguínea</li><li>▪ <b>TAD positivo:</b> continuar o teste</li></ul>
8	Continuar a incubação do tubo-teste. Retirar alíquotas dos eritrócitos-teste em intervalos de 30 minutos e realizar o TAD, até o máximo de duas horas de incubação
9	<b>Interpretação:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>TAD negativo:</b> eritrócitos podem ser utilizados para tipagem sanguínea</li><li>▪ <b>TAD positivo após duas horas de incubação:</b> realizar o método de bloqueio de IgG</li></ul>

**Notas:**

1. A solução de difosfato de cloroquina pode ser preparada em farmácia de manipulação.

2. Manter a proporção de 4 partes de cloroquina para 1 parte de eritrócitos-teste.

3. A centrífuga deve ser calibrada para padronizar o tempo e a velocidade de centrifugação.

4. Incubação dos eritrócitos por mais de duas horas pode prejudicar a reatividade antigênica. Frações de proteínas do complemento não são removidas pela cloroquina.

TAD, teste da antiglobulina direto (Coombs direto).

**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.11 Método 10 – Bloqueio de IgG em eritrócitos com TAD positivo	
	<b>Reagentes:</b> eritrócitos-teste com TAD positivo, soro de Coombs monoespecífico (anti-IgG), salina (NaCl 0,9%)
1	Lavar as eritrócitos-teste 3 a 4 vezes com solução salina
2	Pipetar uma gota dos eritrócitos-teste em tubo de ensaio 12x75mm
3	Pipetar 20 gotas do soro de Coombs monoespecífico
4	Homogeneizar e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente (20-24 °C)
5	Lavar os eritrócitos-teste 3 a 4 vezes com solução salina
6	Realizar o TAD
7	<b>Interpretação:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>TAD negativo:</b> eritrócitos podem ser utilizadas para tipagem sanguínea</li><li>▪ <b>TAD positivo:</b> repetir o teste novamente</li></ul>

**Notas:**  
1. Amostras com TAD > 2+ devem ser tratadas previamente pelo difosfato de cloroquina.  
2. A amostra pode ser incubada por até 15 a 20 minutos.  
TAD, teste da antiglobulina direto (Coombs direto)  
**Fonte:** Sererat e colaboradores.<sup>20</sup>

QUADRO 14.12 Método 11 – Calibração da centrífuga com velocidade fixa para aglutinação imediata																																								
	<b>Material e reagentes:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>Para anticorpos em meio salino:</b> soro de indivíduo do grupo A (anti-B) diluído com albumina a 6% para dar aglutinação de 1+ Albumina a 6%: diluir 1,5 mL de albumina bovina a 22% em 4 mL de solução salina<ul style="list-style-type: none"><li>– <b>Controle positivo:</b> eritrócitos B diluídos 2 a 5% em solução salina (NaCl 0,9%)</li><li>– <b>Controle negativo:</b> eritrócitos A diluídos 2 a 5% em solução salina.</li></ul></li><li>▪ <b>Para anticorpos em meio proteico:</b> anti-D diluído com albumina a 22% para dar aglutinação de 1+<ul style="list-style-type: none"><li>– <b>Controle positivo:</b> eritrócitos RhD positivos diluídos 2 a 5% em solução salina</li><li>– <b>Controle negativo:</b> eritrócitos RhD negativos diluídos 2 a 5% em solução salina</li></ul></li></ul>																																							
1	Identificar cinco tubos positivos (POS) e cinco tubos negativos (NEG) para cada teste (reagente em meio salino e meio proteico)																																							
2	Adicionar anti-B diluído em 10 tubos (5 B POS e 5 B NEG) e anti-D diluído em 10 tubos (5 D POS e 5 D NEG)																																							
3	Adicionar os eritrócitos em um par de tubos para cada antissoro (1 B POS e 1 B NEG; 1 D POS e 1 D NEG). Centrifugar por 10 segundos, observar o resultado conforme tabela abaixo, graduar e registrar a aglutinação																																							
4	Repetir o item 3 para cada intervalo de tempo (15, 20, 30 e 45 segundos)																																							
5	Selecionar o tempo ótimo de centrifugação conforme tabela abaixo. Anotar o tempo de centrifugação no equipamento.																																							
	<b>Exemplo de resultado de calibração da centrífuga sorológica com velocidade fixa</b>																																							
	<table><tr><th rowspan="2">CRITÉRIO</th><th colspan="5">TEMPO (SEGUNDOS)</th></tr><tr><th>10</th><th>15</th><th>20</th><th>30</th><th>45</th></tr><tr><td>Sobrenadante límpido?</td><td>não</td><td>não</td><td>sim</td><td>sim</td><td>sim</td></tr><tr><td>Botão de eritrócitos bem-delineado?</td><td>não</td><td>não</td><td>não</td><td>sim</td><td>sim</td></tr><tr><td>Células ressuspendem facilmente?</td><td>sim</td><td>sim</td><td>sim</td><td>sim</td><td>não</td></tr><tr><td>Intensidade da aglutinação</td><td>±</td><td>±</td><td>1+</td><td>1+</td><td>1+</td></tr></table>					CRITÉRIO	TEMPO (SEGUNDOS)					10	15	20	30	45	Sobrenadante límpido?	não	não	sim	sim	sim	Botão de eritrócitos bem-delineado?	não	não	não	sim	sim	Células ressuspendem facilmente?	sim	sim	sim	sim	não	Intensidade da aglutinação	±	±	1+	1+	1+
CRITÉRIO	TEMPO (SEGUNDOS)																																							
	10	15	20	30	45																																			
Sobrenadante límpido?	não	não	sim	sim	sim																																			
Botão de eritrócitos bem-delineado?	não	não	não	sim	sim																																			
Células ressuspendem facilmente?	sim	sim	sim	sim	não																																			
Intensidade da aglutinação	±	±	1+	1+	1+																																			
	<b>Nota:</b> Nesse exemplo, o tempo ótimo de centrifugação é de 30 segundos.																																							

**Nota:** A calibração de centrífuga com velocidade variável pode ser realizada alternando-se os parâmetros tempo e velocidade. Exemplo: velocidade 1.000 rpm, 1.500 rpm, 2.000 rpm, 2.500 rpm, 3000 rpm e 3.500 rpm, utilizando os tempos de 15, 30 e 60 segundos para cada velocidade.  
**Fonte:** Adaptado de American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>



QUADRO 14.13 Método 12 – Calibração da centrífuga com velocidade fixa para lavagem e teste da antiglobulina humana

	<b>Material e reagentes:</b> Antiglobulina humana - AGH (soro de Coombs), solução salina (NaCl 0,9%), anti-D <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>Controle positivo (POS):</b> eritrócitos RhD positivo diluídos 2 a 5% em solução salina e incubadas com anti-D diluído por 15 minutos a 37 °C para dar uma aglutinação de 1+, após adição de antiglobulina humana (soro de Coombs)</li><li>▪ <b>Controle negativo (NEG):</b> eritrócitos RhD positivo diluídos 2 a 5% em solução salina e incubados com albumina a 6% por 15 minutos a 37 °C</li></ul>
1	Identificar cinco tubos positivos (POS) e cinco tubos negativos (NEG). Adicionar uma gota de eritrócitos POS e uma gota de eritrócitos NEG em cada um dos respectivos tubos
2	Completar os tubos com salina e centrifugar em pares (1 NEG e 1 POS) para cada tempo. Exemplo: 30, 45, 60, 90 e 120 segundos. Os eritrócitos devem formar um botão bem-delineado, com o mínimo de células livres no sobrenadante. Após a decantação da salina, o botão de eritrócitos deve ser facilmente ressuspenso. O tempo ótimo de centrifugação é o menor tempo que atende esses requisitos
3	Repetir a lavagem dos tubos por mais três vezes utilizando o tempo ótimo de centrifugação encontrado
4	Decantar todo o sobrenadante e adicionar duas gotas da antiglobulina humana em um par de tubos (1 NEG e 1 POS). Centrifugar por 10 segundos e registrar o resultado. Repetir para cada um dos intervalos (15, 20, 30 e 45 segundos)
5	Selecionar o tempo ótimo de centrifugação. Anotar o tempo ótimo de lavagem e de centrifugação no equipamento.

**Nota:** A calibração de centrífuga com velocidade variável pode ser realizada alternando-se os parâmetros tempo e velocidade. Exemplo: velocidade 1.000 rpm, 1500 rpm, 2000 rpm, 2500 rpm, 3000 rpm e 3500 rpm, utilizando os tempos de 30, 45 e 60 segundos (lavagem) ou 15, 30 e 60 segundos (AGH) para cada velocidade.

**Fonte:** American Association of Blood Banks.<sup>2</sup>

REFERÊNCIAS

1. Girello AL, Kühn TIBB. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. 2. ed. São Paulo: SENAC; 2007.

2. American Association of Blood Banks. Technical manual. 16th ed. Bethesda: AABB, 2008.

3. Harmening, D. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006.

4. Daniels G. Variants of RhD: current testing and clinical consequences. Br J Haematol. 2013;161(4):461-70.

5. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. Clin Lab. 2002;48(1-2):53-9.

6. Flegel WA, Denomme GA, Yazer, MH. On the complexity of D antigen typing: a handy decision tree in the age of molecular blood group diagnostics. J Obstet Gynaecol Can. 2007;29(9):746-52.

7. Bromilow I. D ou não D: eis a questão (DIAMED AG). ABO Rev Med Transfus. 2007;31:15-21.

8. Reid M, Lomas-Francis C. The blood group antigen: facts book. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2004.

9. Schonewille H, van de Watering LMG, Loomans DSE, Brand A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. Transfusion. 2006;46(2):250-6.

10. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. 11th ed. Oxford: Blackwell; 2005.

11. Hillyer CD, Shaz BH, Zimring JC, Abshire TC. Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects. London: Elsevier; 2009.

12. Bruce DG, Tinegate HN, Williams M, Babb R, Wells AW. Antenatal monitoring of anti-D and anti-c: could titre scores determined by column agglutination technology replace continuous flow analyser quantification? Trans Med. 2013;23(1):36-41.

13. Immucor. NEO: high throughput full automation [Internet]. Lisboa: Immucor; c2014 [capturado em 13 maio 2015]. Disponível em: [http://www.immucor.com/en-us/Products/Documents/Immucor\\_NEO-Brochure\\_US\\_web.pdf](http://www.immucor.com/en-us/Products/Documents/Immucor_NEO-Brochure_US_web.pdf).

14. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Programas de avaliação externa da qualidade em imuno-hematologia [Internet]. [S.l.]: ABHH; c2014 [capturado em 13 maio 2015]. Disponível em: [http://imunohe-matologia.com.br/ello\\_plugins/content/content.php?recent.2](http://imunohe-matologia.com.br/ello_plugins/content/content.php?recent.2).

15. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 2712, de 12 de novembro de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Brasília: DOU; 2013.

16. Novaretti MCZ, Bueno VJ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Controle de qualidade interno de reagentes em imuno-hematologia: aspectos práticos. Rev Bras Hematol Hemoter. 2002;24(4):270-85.

17. Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 13th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2007.

18. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. Gooch A, Parker J, Wray J, Qureshi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. Transfus Med. 2007;17(4):252-62.

19. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force, Parker J, Wray J, Gooch A, Robson S, Qureshi H. Guidelines for the use of prophylactic anti-D immunoglobulin [Internet]. London: BCSH; 2008 [capturado em 13 abr 2015]. Disponível em: [http://www.bcsghguidelines.com/documents/Anti-D\\_bcsgh\\_07062006.pdf](http://www.bcsghguidelines.com/documents/Anti-D_bcsgh_07062006.pdf).

20. Sererat TS, Veidt D, Dutched A. A quick and simple method for phenotyping IgG-sensitized red blood cells. Immunohematology. 2000;16(4):154-6.



## Leituras Recomendadas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Agree PC, Davies DM, Issit PD, Lamy BM, Schmidt PJ, Treacy M, et al. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion*. 1992;32(1):86-7.
- Baiochi E, Nardozza LMM. Aloimunização. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(6):311-9.
- Bajpai M, Kaur R, Gupta E. Automation in immunohematology. *Asian J Transfus Sci*. 2012;6(2):140-4.
- Barros C, Otta M, Wakim VL, Zaqueroni M, Baleotti JR W, Castilho L. Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(4):269-74.
- Bettelheim D, Panzer S, Reesink HW, Csapo B, Pessoa C, Guerra F, et al. Monitoring and treatment of anti-D in pregnancy. *Vox Sang*. 2010;99(2):177-92.
- Castilho SL, Prearo V, Rodrigues KS, Duarte MEL. Desempenho da tecnologia dos eritrócitos magnetizados (E.M.® Technology). *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(5):374-8.
- Credidio DC, Pellegrino JR J, Castilho L. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology*. 2011;27(1):6-10.
- Daniels G, Bromilow I. Essential guide to blood groups. Oxford: Blackwell; 2007.
- Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*. 2008;48(3):473-8.
- Engelfriet CP, Reesink HW. Laboratory procedures for the prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. *Vox Sanguinis*. 1995;(69):61-9.
- Engelfriet CP, Reesink HW. Testing for weak D. *Vox Sang*. 2006;90:140-3.
- Flegel WA, Von Zabern I, Wagner FF. Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*. 2009;49(3):465-71.
- Fresenius Hemocare. Controle de qualidade de reagentes em imuno-hematologia. Itapeverica da Serra: Fresenius HemoCare; 2005.
- Garraty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion*. 2005;45(10):1547-51.
- Howard H, Martlew V, Mcfaden I, Clarke C, Duguid J, Bromilow I, et al. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunization. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998;78(1):F62-6.
- Huchet J, Dallemagne S, Huchet C, Brossard Y, Larsen M, Parnet-Mathieu F. Ante-partum administration of preventive treatment of Rh-D immunization in rhesus-negative women. Parallel evaluation of transplacental passage of fetal blood cells. Results of a multicentre study carried out in the Paris region. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 1987;16:101-11.
- James RM, McGuire W, Smith DP. The investigation of infants with RhD-negative mothers: can we safely omit the umbilical cord blood direct antiglobulin test? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2011;96(4):F301-4.
- Judd WJ, Moulds M, Schlanser G. Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. *Immunohematology*. 2005;21(4):146-8.
- Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Hass M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion*. 2008;48(5):941-52.
- Kormoczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*. 2005;45(10):1561-7.
- Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*. 1990;30(2):109-13.
- Mackenzie IZ, Bowell P, Gregory H, Pratt G, Guest C, Entwistle CC. Routine antenatal rhesus D immunoglobulin prophylaxis: the results of a prospective 10 year study. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999;106(5):492-7.
- Mayne S, Parker JH, Harden TA, Dodds SD, Beale JA. Rate of RhD sensitization before and after implementation of a community based antenatal prophylaxis programme. *Br Med J*. 1997;315(7122):1588.
- Moise KJ. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*. 2000;92(1):75-81.
- Mollinson PL, Engelfreit CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 10th ed. Oxford: Blackwell; 1997.
- Moran P, Robson SC, Reid MM. Anti-E in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 2000;107(11):1436-8.
- Rosa KA, Reid ME, Lomas-Francis C, Powell VI, Costa FF, Stingham ST, et al. Rhnull syndrome: identification of a novel mutation in RHce. *Transfusion*. 2005;45(11):1796-8.
- Sbarsi I, Isernia P, Montanari L, Badulli C, Martinetti M, Salvaneschi L. Implementing non-invasive RHD genotyping on cell-free foetal DNA from maternal plasma: the Pavia experience. *Blood Transfus*. 2012;10(1):34-8.
- Stingham ST, Baldon JP, Jucksch MMF. Importância da utilização de hemácias Di(a+) na pesquisa e identificação de anticorpos irregulares. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2003;25(2):224.
- Thompson S, Egginton J, Dodd A, Qureshi R, Turner E. Late developing red cell antibodies in pregnancy. *Trans Med*. 2003;13:8-9.
- Tovey LAD, Townley A, Stevenson BJ, Taverner J. The Yorkshire antenatal anti-D trial in primigravidae. *Lancet*. 1983;2(8244):244-6.
- U.S. Food and Drug Administration. Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion: annual summary for fiscal year 2013 [Internet]. Silver Spring: FDA; 2014 [capturado em 09 nov 2014]. Disponível em: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/ucm391574.htm>.
- Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000;95(12):3662-8.
- Weisbach V, Kohnhauser T, Zimmermann R, Ringwald J, Straszer E, Zingsem J, et al. Comparison of the performance of the microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strength solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies. *Transfus Med*. 2006;16(4):276-84.
- Westhoff CM. Review: the Rh blood group D antigen . . . dominant, diverse, and difficult. *Immunohematology*. 2005;21(4):155-63.



**Esta página foi deixada em branco intencionalmente**



# ÍNDICE



Números de páginas seguidos de *f* referem-se a figuras e *t* a tabelas

## A

- Abetalipoproteinemia, 188
- Acantocitose hepatopática, 188
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 8-10
- Aglutinação eritrocitária, 57-58, 392
- Agregação plaquetária, 341-343
- Aloimunização eritrocitária, 402-404
- Amostras, 3-4, 8
  - homogeneização após a coleta, 8
  - homogeneização previamente à análise, 8
  - identificação das, 3-4
- Anemias, 110-200, 292-293, 330-331
  - avaliação laboratorial, 110-123
    - histogramas, 116, 117-123
    - tecnologia *laser*, 117-123
  - interpretação do eritrograma, 110-116, 117
    - CHCM, 113-115
    - contagem de eritrócitos, 111
    - dosagem de hemoglobina, 111
    - HCM, 113
    - hematócrito, 111-112
    - RDW, 115-116
    - VCM, 112-113
  - classificação fisiopatológica, 124-133
  - classificação morfofisiológica, 133-200
    - macrocíticas, 171-179
      - megaloblásticas, 173
      - não megaloblásticas, 172-173
    - microcíticas e hipocrômicas, 135-171
      - anemia de doença crônica, 142-143
      - anemia ferropriva, 135-142
      - anemia sideroblástica, 143-145
      - hemocromatose, 169-170
      - hemoglobinopatias variantes, 152-168
      - porfirias, 170-171
      - talassemias, 145-152, 153
    - normocíticas e normocrômicas, 180-195
      - IPR aumentado, 180-195
        - anemia pós-hemorragica, 180
        - anemias hemolíticas, 180-190
        - não hemolíticas, 195-200
      - normocíticas e normocrômicas não hemolíticas, 196-200
        - anemia das doenças hepáticas, 197
        - anemias por falência da medula óssea, 197-198
        - doenças hormonais, 196-197
        - eritrocitoses, 199-200
        - insuficiência renal crônica, 197
        - meta-hemoglobinemias, 198-199
        - classificação morfológica, 123-124
          - de Fanconi, 330-331
        - refratária com sideroblastos em anel associada à intensa trombocitose (ARSA-T), 292-293
      - Angiogênese, 205-208
      - Anisocitose, 33-34, 51-53, 62
      - Anomalia(s), 260, 261-262, 331
        - de Alder-Reilly, 262
        - de May-Hegglin, 261-262, 331
        - de Pelger-Huet, 260, 261f
      - Anticoagulantes, 8-12
      - Anticorpos circulantes, 14
      - Antitrombina, 373-374
      - Apendicite, 245
      - Artrite, 245-247
        - infecciosa, 245-246
        - reumatoide, 246-247
      - Aterosclerose, 321-323
      - Ativador, 381
        - tecidual (t-PA), 381
        - tipo uroquinase (u-PA), 381
      - Avaliação macroscópica de lâminas, 48
      - Avaliação microscópica de lâminas, 48-50

## B

- Basófilos, 214, 225
- Bastonetes, 212-213

## C

- Células grandes e não coradas, 27
- Células progenitoras hematopoiéticas, 27-28
- Centrifugação, 13
- Cininogênio de alto peso molecular (HK), 360
- Citomegalovírus, 256-257
- Citometria de fluxo, 343
- Citrato de sódio, 10-12
- Coagulação, 345-346, 371-376, 388
  - fatores da, 345-346, 388
  - inibidores fisiológicos da, 371-376
  - trombofilias, 372-376
- Coagulação intravascular disseminada (CIVD), 369-371
- Coagulopatias, 356-371
  - adquiridas, 362-371
    - coagulação intravascular disseminada
    - deficiência de vitamina K, 363
    - doença hepática, 363
    - inibidores da coagulação (anticorpos), 363-364



- síndrome antifosfolípideo (SAF), 364-369  
 hereditárias, 356-362  
   cininogênio de alto peso molecular (HK), 360  
   deficiência do fator I, 360-361  
   deficiência do fator II, 358  
   deficiência do fator V, 359  
   deficiência do fator VII, 358-359  
   deficiência do fator X, 359  
   deficiência do fator XI, 359  
   deficiência do fator XII, 359-360  
   deficiência do fator XIII, 359  
   doença de von Willebrand, 361-362  
   hemofilia A, 356-358  
   hemofilia B, 356-358  
   pré-caliceína (PK), 360  
 Coleta sanguínea, 4-6  
 Contagem diferencial  
   estendida, 26-29, 30f  
   células grandes e não coradas, 27  
   células progenitoras hematopoiéticas, 27-28  
   eritroblastos 29, 30f  
   granulócitos imaturos, 28-29  
 Coombs direto e indireto *ver*  
   Teste da antiglobulina humana
- D**
- D-dímero, 388  
 Deficiência(s), 188, 190, 363  
   da piruvatoquinase (PK), 190  
   de LCAT, 188  
   de vitamina K, 363  
 Dengue, 257  
 Detecção e contagem de células, tecnologia de, 17, 19-21  
   método elétrico, 19-21  
   impedância, 19-20  
   radiofrequência, 21  
   método óptico, 21  
 Disenteria, 247  
   amebiana, 247  
   bacilar, 247  
 Doença(s), 187, 194-195, 196-197, 361-362, 363  
   de von Willebrand, 361-362  
   do Rh nulo, 187  
   hemolítica do recém-nascidos, 194-195  
   hepática, 197, 363  
   anemia da, 197  
   hormonais, 196-197  
 Dosagem, 387-388  
   do fibrinogênio (FBG), 387-388  
   dos fatores da coagulação, 388
- E**
- Eliptocitose hereditária, 186-187  
 Endocardite, 247  
 Eosinófilos, 214, 223-225  
 Eritroblastos 29, 30f  
 Eritrocitoses, 199-200  
 Eritroenzimopatias, 188-189
- Eritrograma, 93-134  
   anemias, 110-134  
     avaliação laboratorial, 110-123  
     classificação das, 123-134  
   eritropoiese, 93-104  
     cadeias do tipo alfa ( $\alpha$ ), 100  
     cadeias do tipo beta ( $\beta$ ), 101-102  
     eritropoietina, 94-95  
     ferro, 95-98  
     molécula da hemoglobina, 99-101  
     via metabólica de síntese do heme, 102-104  
     vitamina B<sub>12</sub> e folato, 98-99  
   metabolismo energético do eritrócito, 104-108  
     circulação eritrocitária – membrana eritrocitária, 105-106  
     destruição eritrocitária, 106-108  
 Esferocitose hereditária, 184-186  
 Estomatocitose hereditária, 187-188  
 Extensões sanguíneas, 12, 41-49  
   coloração das extensões  
     sanguíneas, 43-47  
     corantes rápidos, 46-47  
     pelo método de Leishman, 46  
     pelo método de May-Grünwald  
     GIEMSA, 44-45  
     pelo método de Wright, 45-46  
     requisitos para uma coloração adequada, 47-48  
   preparo da, 12, 41-43  
   artefatos, 48, 49t
- F**
- Fase analítica, 17-39  
   analísadores hematológicos e automação, 17-39  
     alertas suspeitos, 24-25  
     contagem diferencial estendida, 26-29, 30f  
     identificação e classificação das células, 22-24  
     interferências nas análises, 26  
     novos parâmetros, 29-39  
     sistemas automatizados, 17  
     tecnologia de detecção e contagem de células, 17, 19-21  
   análise morfológica e hemograma, 41-69  
     artefatos do preparo de extensões sanguíneas, 48, 49t  
     avaliação da lâmina, 48-51  
     coloração das extensões sanguíneas, 43-47  
     leitura de lâminas, 51-62, 66, 67f  
     liberação de resultados, 66-69  
     preparo da extensão sanguínea, 41-43  
 Fase pós-analítica, 317-388  
   hemostasia primária, 319-343  
   hemostasia secundária, 345-388  
 Fase pré-analítica, 1-15  
   variáveis de coleta e manipulação da amostra, 3-13
- anticoagulantes, 8-12  
 centrifugação, 13  
 coleta sanguínea, 4-6  
 confecção das extensões sanguíneas, 12  
 efeitos da infusão, 4  
 homogeneização das amostras, 8  
 identificação das amostras, 3-4  
 material do tubo, 7-8  
 ordem dos tubos na coleta, 7  
 tempo de garroteamento, 6-7  
 transporte e processamento, 12-13  
 variáveis endógenas, 13-14  
   anticorpos circulantes, 14  
   medicamentos e analitos, 13-14  
 variáveis fisiológicas, 1-3  
   altitude e gravidez, 3  
   estilo de vida, 3  
   exercício físico e ritmo circadiano, 3  
   idade, sexo, raça, jejum e postura, 2-3  
   situação clínica, 1-2  
 Fator V de Leiden, 375  
 Fatores da coagulação, 345-346, 388  
   dosagem dos, 388  
 Febre amarela, 258  
 Ferro, 95-98, 136-142, 151-152  
   características laboratoriais da deficiência, 136-142, 151-152  
   capacidade de transporte de ferro, 138-139  
   CHr, 137-138  
   CHr e índices TfRs/ferritina e TfRs e TfRs/log ferritina, 141-142  
   ferritina, 138-139  
   ferro sérico, 138-139  
   hemograma, 136-137  
   índice de saturação de transferrina, 138-139  
   receptor solúvel de transferrina (sTfR), 140-141  
 Fibrinogênio (FBG), 354-355, 375, 387-388  
   concentração elevada de, 375  
   dosagem do, 387-388  
 Folato, 98-99, 175-176  
   deficiência de, 175-179  
     achados laboratoriais, 176-177  
     diagnóstico diferencial, 177-178  
     tratamento, 178-179
- G**
- Garroteamento, tempo de, 6-7  
 Gastreenterite por salmonela, 247-248  
 Granulócitos imaturos, 28-29
- H**
- Hemocromatose, 169-170  
 Hemofilia A, 356-358  
 Hemofilia B, 356-358  
 Hemoglobina (s), 99-101, 190  
   instáveis, 190  
   molécula da, 99-101



- Hemoglobinopatias variantes, 152-168  
 hemoglobinopatia C, 161, 162f  
 hemoglobinopatia D, 161-162  
 hemoglobinopatia E, 162  
 hemoglobinopatia SC, 158-160  
 hemoglobinopatia S, 153-158, 161  
 características laboratoriais, 158-159f  
 com outras associações, 161  
 diagnóstico, 157-158  
 haplótipos, 156  
 hemoglobina fetal, 156-157  
 métodos para o diagnóstico, 163-168  
 concentração de hemoglobina fetal, 168  
 concentração de meta-hemoglobina, 168  
 eletroforese de hemoglobina, 163-164  
 eletroforese em acetato de celulose em pH ácido, 165-166  
 eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino, 164-165  
 pesquisa de corpos de Heinz e precipitados de hemoglobina H, 168  
 quantificação da fração A2, 167  
 teste de precipitação pelo isopropanol, 168  
 pesquisa de hemoglobina S, 166-167  
 Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), 312-313  
 Hemólise, 181-195  
 por fragmentação mecânica intravascular, 195  
 predominantemente extravascular, 183-195  
 anemias hemolíticas adquiridas, 190  
 anemias hemolíticas adquiridas causadas por isoanticorpos, 194-195  
 anemias hemolíticas adquiridas com mecanismo imune, 190-194  
 deficiência da piruvatoquinase (PK), 190  
 eliptocitose hereditária, 186-187  
 eritroenzimopatias, 188-189  
 esferocitose hereditária, 184-186  
 estomatocitose hereditária, 187-188  
 hemoglobinas instáveis, 190  
 predominantemente intravascular, 181-183  
 Hemorragia e trombose, 382-383  
 Hemossedimentação, velocidade de, 252-254  
 Hemostasia primária, 317-343  
 avaliação laboratorial, 338-343  
 agregação plaquetária, 341-343  
 citometria de fluxo, 343  
 constantes plaquetárias e plaquetas reticuladas, 343  
 contagem de plaquetas, 339-340  
 morfologia plaquetária, 339  
 tempo de sangramento, 341  
 plaquetas, 323-338  
 inibição da função plaquetária, 329  
 micropartículas plaquetárias, 329-330  
 papel na hemostasia, 329  
 púrpuras plaquetárias, 330-337  
 trombocitopenia, 323-324  
 trombocitoses, 337-338  
 trombopoietina (TPO), 324-325  
 plaquetas e trombose, 338  
 vaso sanguíneo, 319-323  
 aterosclerose, 321-323  
 estrutura do, 319-320  
 tromborregulação, 320-321  
 Hemostasia secundária, 345-388  
 avaliação laboratorial, 383-388  
 D-dímero, 388  
 dosagem do fibrinogênio (FBG), 387-388  
 dosagem dos fatores da coagulação, 388  
 tempo de protrombina (TP), 383-385  
 tempo de trombina (TT), 387  
 tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), 385-387  
 cascata da coagulação sanguínea *in vivo*, 355-356  
 coagulopatias, 356-371  
 adquiridas, 362-371  
 hereditárias, 356-362  
 cofatores celulares, 354  
 fator III, 354  
 cofatores solúveis, 352-354  
 fator de von Willebrand, 353-354  
 fator V, 352  
 fator VIII, 352-353  
 fatores da coagulação, 345-346  
 inibidores fisiológicos da coagulação, 371-376  
 trombofilias, 372-376  
 proteína estrutural – fibrinogênio, 354-355  
 sistema fibrinolítico, 380-383  
 deficiências do, 382-383  
 inibidores do, 381  
 plasminogênio, 380-381  
 regulação do, 381-382  
 trombose, 376-380  
 controle da terapia antitrombótica, 378-380  
 embolia pulmonar, 378f  
 zimogênios, 347-351  
 fatores dependentes de vitamina K, 347-350  
 fatores não dependentes de vitamina K, 350-352  
 Heparina, 10  
 Hepatite viral, 258  
 Hiper-homocisteinemia, 374-375  
 Hipocromia, 55  
**I**  
 Imuno-hematologia eritrocitária, 391-426  
 aglutinação eritrocitária, 392  
 aloimunização eritrocitária, 402-404  
 controle de qualidade em, 413-426  
 controle de equipamentos, 415, 425-426  
 controle interno a cada lote, 413-415  
 controle interno diário, 415  
 leitura, interpretação e registro dos resultados, 415, 416  
 métodos laboratoriais, 415, 417-426  
 graduação da reação de aglutinação e escore numérico, 392-393  
 identificação de anticorpos irregulares, 407-408  
 quantificação em gestantes, 408  
 metodologias utilizadas na, 410-413  
 ensaio de aderência de eritrócitos em fase sólida, 412  
 método de aglutinação em coluna (gel-teste), 410-412  
 método em lâmina, 410  
 método em microplaca, 410, 411f  
 método em tubo, 410  
 tecnologia dos eritrócitos magnetizados, 413  
 quantificação de anticorpos antieritrocitários, 408-409  
 com analisador de fluxo contínuo, 408  
 com citometria de fluxo, 408-409  
 fenotipagem paterna, 409  
 genotipagem eritrocitária fetal, 409  
 titulação de anticorpos pelo método de gel-teste utilizando escore, 408-409  
 titulação de anticorpos pelo TAI em tubo, 408  
 sistema ABO, 393-397, 420-425  
 anticorpos ABO, 394-395  
 antígenos ABO, 393, 394t  
 discrepâncias ABO, 395-397, 420, 422, 424-425  
 subgrupos ABO fracos, 393-394  
 tipagem sanguínea ABO, 395, 417  
 sistema Rh, 397-402, 418  
 antígenos D variantes, 397-399  
 antígenos Rh, 397  
 escolha do reagente, 399-400  
 resolução de discrepâncias, 401-402  
 Rhnull, 400-401  
 tipagem sanguínea, 401, 418  
 teste da antiglobulina humana, 404-407, 409-410  
 direto, 409-410  
 indireto, 404-407  
 Inclusões eritrocitárias, 55  
 Infecção(ões), 248-249  
 pulmonar, 248  
 urinária, 248-249  
 Infusão, efeitos da, 4  
 Inibidor(es), 363-364, 374  
 da coagulação (anticorpos), 363-364



da via do fator tissular, 374  
Insuficiência renal crônica, 197

**L**

Lâminas, 48-62, 66, 67f  
avaliação macroscópica, 48  
avaliação microscópica, 48-50  
leitura de, 51-62, 66, 67f  
automação, 66, 67f  
guia de padronização, 51-62  
Leptospirose, 249  
Leucemia eosinofílica crônica/  
síndromes eosinofílicas (LEC/SE), 285  
Leucemia mieloide crônica (LMC),  
280-283  
atípica (LMCa), 291-292  
Leucemia neutrofílica crônica, 283-284  
Leucemia linfoblástica aguda  
(LLA), 298-300  
tipo L1 (LLA-L1), 298  
tipo L2 (LLA-L2), 298  
tipo L3 (LLA-L3), 298-300  
Leucemia linfocítica crônica  
(LLC), 300-305  
de células pilosas (LCP), 304-305  
pró-linfocítica crônica (LPC), 304  
Leucemia mielomonocítica crônica  
(LMMC), 288-291  
Leucemias agudas bifenotípicas, 297  
Leucemias mieloides agudas  
(LMAS), 294-297  
com alterações relacionadas a  
mielodisplasias, 296  
com anormalidades genéticas  
recorrentes, 296  
não especificadas separadamente  
(NOS), 296-297  
proliferações mieloides relacionadas  
com síndrome de Down, 297  
relacionadas a tratamento (t-LMA), 296  
sarcoma mieloide, 297  
Leucócitos, 62-64, 84  
classificação, 62-64  
correção da contagem  
automatizada, 64  
interobservadores, 84  
Leucograma, 205-254, 255-262  
análise da medula óssea, 208-210  
angiogênese, 205-208  
anomalias leucocitárias, 260-262  
anomalia de Alder-Reilly, 262  
anomalia de May-Hegglin, 261-262  
anomalia de Pelger-Hüet, 260, 261f  
síndrome de Chediak-Higashi,  
260-261  
apendicite, 245  
artrite infecciosa, 245-246  
artrite reumatoide, 246-247  
basófilos, 214, 225  
bastonetes, 212-213  
disenteria amebiana, 247  
disenteria bacilar, 247  
endocardite, 247  
eosinófilos, 214, 223-225

gastrenterite por salmonela, 247-248  
infecção pulmonar, 248  
infecção urinária, 248-249  
leptospirose, 249  
lúpus eritematoso sistêmico, 249-250  
linfócitos, 214, 225-232, 255  
diferenciação dos linfócitos B,  
228-232  
diferenciação dos linfócitos T –  
timo, 226-228  
linfocitose, 255  
linfopenia, 255  
malária, 250-251  
meningite, 251  
metamielócitos, 212-213  
mieloblasto, 210-211  
mielócito, 211-212  
monócitos, 214-215, 221-223  
e sistema fagocitário  
mononuclear, 221-223  
monocitose e monocitopenia, 243-245  
morfologia das células  
hematopoiéticas normais, 210-215  
neutrofilia e neutropenia, 240-243, 244  
neutrófilos, 215-221  
dificuldades de interpretação,  
217-221  
pró-mielócito, 211  
processo infeccioso bacteriano  
agudo, 235-240  
processo inflamatório crônico, 240  
processos amigdalianos, 245  
processos infecciosos virais, 255-256  
citomegalovírus, 256-257  
dengue, 257  
febre amarela, 258  
hepatite viral, 258  
mononucleose infecciosa, 258-259  
síndrome de imunodeficiência  
adquirida, 259-260  
segmentados, 212-213  
septicemia, 251-252  
velocidade de hemossedimentação,  
252-254  
Liberação de resultados, 64-69  
aprimoramento, 64-66  
automação da leitura de lâminas,  
66, 67f  
liberação sem a revisão  
microscópica, 66-69  
Linfócitos, 214, 225-232, 255  
diferenciação dos linfócitos B, 228-232  
diferenciação dos linfócitos T –  
timo, 226-228  
linfocitose, 255  
linfopenia, 255  
Linfomas, 305-309  
linfoma de Hodgkin (LH), 308  
linfomas não Hodgkin (LNH), 308-309  
Lúpus eritematoso sistêmico, 249-250

**M**

Macrocitose, 51-53

Macroglobulinemia de Waldeström,  
311-312  
Malária, 250-251  
Medula óssea, 197-198, 208-210  
análise da, 208-210  
anemias por falência da, 197-198  
Meningite, 251  
Meta-hemoglobinemias, 198-199  
Metamielócitos, 212-213  
Microcitose, 51-53  
Mieloblasto, 210-211  
Mielócito, 211-212  
Mielofibrose idiopática ou primária  
(MFI), 279-280  
Mieloma múltiplo, 309-311, 312t  
Monócitos, 214-215, 221-223  
Monocitose e monocitopenia, 243-245  
Mononucleose infecciosa, 258-259

**N**

Neoplasias hematológicas, 263-313  
aspectos genéticos, moleculares e  
morfológicos, 266-269  
citogenética, 270-272  
citoquímica, 269-270  
imunofenotipagem, 272-273  
neoplasias linfoides, 298-313  
hemoglobinúria paroxística  
noturna (HPN), 312-313  
leucemia linfoblástica aguda  
(LLA), 298-300  
leucemia linfocítica crônica  
(LLC), 300-305  
linfomas, 305-309  
macroglobulinemia de  
Waldeström, 311-312  
mieloma múltiplo, 309-311, 312t  
neoplasias mieloides, 273-298  
leucemias agudas bifenotípicas, 297  
leucemias mieloides agudas  
(LMAS), 294-297  
mieloproliferativas (NMP), 274-285  
síndromes mielodisplásicas  
mielodisplasias  
(SMDs/MDs), 285-288  
síndromes mielodisplásicas  
neoplasias mieloproliferativas  
(SMDs/NMPs), 288-293  
oncogênese, 263-266  
Neutrofilia e neutropenia, 240-244  
Neutrófilos, 215-221

**O**

Ovalocitose asiática, 187

**P**

Parâmetros hematológicos novos, 29-39  
contagem de plaquetas gigantes  
e de agregados plaquetários, 37  
conteúdo de hemoglobina dos  
eritrócitos, 32-33  
fração de reticulócitos imaturos,  
30-32  
fragmentos eritrocitários, 34-35



- índice de anisocitose, 33-34  
 índices reticulocitários, 30-32  
 parâmetros de massa plaquetária, 37  
 parâmetros de volume  
   plaquetário, 35-37  
 parâmetros leucocitários, 38-39  
 plaquetas reticuladas e fração  
   de plaquetas imaturas, 37-37  
 Piropoiquilocitose hereditária, 187  
 Plaquetas, 61-62, 323-340, 343  
   ativação plaquetária, 327-329  
   constantes plaquetárias e plaquetas  
     reticuladas, 343  
   contagem de, 339-340  
     método alternativo, 340  
     método de Bárbara H.  
       O'Connor, 340  
     método de fônio modificado, 340  
     método de Nosanchunk, Chang  
       e Bennett, 340  
   e trombose, 338  
   estrutura, 325-327  
     citoesqueleto plaquetário, 326  
     membrana citoplasmática, 325-326  
     organelas plaquetárias, 326-327  
     sistema de membrana da  
       plaqueta, 327  
   inibição da função plaquetária, 329  
   leitura de lâminas, 61-62  
     anisocitose plaquetária, 62  
     macroplaquetas, 61  
     microplaquetas, 61  
     plaquetas gigantes, 61  
     satelitismo plaquetário  
       e agregados plaquetários, 62-64  
   micropartículas plaquetárias, 329-330  
   morfologia, 339  
   papel na hemostasia, 329  
   púrpuras plaquetárias, 330-337  
     púrpuras plaquetárias, 336-337  
     púrpuras trombocitopênicas, 330  
     púrpuras trombocitopênicas  
       adquiridas, 333  
     púrpuras trombocitopênicas  
       hereditárias, 330-333  
     púrpuras trombocitopênicas por  
       aumento da destruição ou  
       consumo, 333-336  
   trombocitopoiese, 323-324  
   trombocitoses, 337-338  
   trombopoietina (TPO), 324-325  
 Plasminogênio, 380-381  
   ativador tecidual (t-PA), 381  
   ativador tipo uroquinase (u-PA), 381  
 Poiquilocitose, 53-54, 55t  
 Policitemia vera (PV), 278-279  
 Policromatofilia, 54-55  
 Porfirias, 170-171  
 Pró-mielócito, 211  
 Processo(s), 235-240, 245, 255-260  
   amigdalianos, 245  
   infeccioso bacteriano agudo, 235-240  
   inflamatório crônico, 240  
   infecciosos virais, 255-260  
     citomegalovírus, 256-257  
     dengue, 257  
     febre amarela, 258  
     hepatite viral, 258  
     mononucleose infecciosa, 258-259  
     síndrome de imunodeficiência  
       adquirida, 259-260  
 Proteína, 372-373  
   C, 372-373  
   S, 373  
 Protrombina, mutações do gene da, 374  
 Púrpuras plaquetárias, 336-337  
   trombocitopenia causada por  
     medicamentos, 336-337  
   trombocitopenias por  
     hiperesplenismo, 336  
 Púrpuras trombocitopênicas, 330-336  
   adquiridas, 333  
   hereditárias, 330-333  
     anemia de Fanconi, 330-331  
     anomalia de May-Hegglin, 331  
     defeitos relacionados com a  
       secreção de grânulos  $\alpha$ , 332  
     defeitos relacionados com a  
       secreção dos corpos  
       densos, 332-333  
     síndrome da ausência de rádio, 331  
     síndrome de Bernard-Soulier,  
       331, 332f  
     síndrome de Wiskott-Aldrich, 331  
     tromboastenia de Glanzmann,  
       331-332  
   por aumento da destruição ou  
     consumo, 333-336  
   púrpura trombocitopênica  
     imune, 335  
   púrpura trombocitopênica  
     trombótica e síndrome urêmica  
     hemolítica, 333-335  
   trombocitopenia induzida pela  
     heparina, 335-336
- Q**
- Qualidade, 71-91  
   avaliação de equipamentos, 74, 75t  
   controle em laboratórios, 74-77  
   controle externo, 86  
   controle interno, 77-86  
     amostras retidas de pacientes, 82-83  
     autoverificação das contagens  
       (delta check), 84-85  
     avaliação da contagem diferencial  
       de leucócitos interobservadores, 84  
     controle de procedimentos e  
       pessoal, 85-86  
     controle dos passos analíticos, 77-79  
       calibração inicial, 77-78  
       reagentes e manutenções  
       preventivas, 77  
       verificação da calibração com  
       controles comerciais, 78-79  
   controles comerciais, 78-80  
   médias móveis dos pacientes, 80-82  
   regra de 3 ou regras de ouro, 83-84  
   diferença entre resultados, 88-89  
   escolha do analisador hematológico,  
     72-74  
   especificações, 89-90  
   fase pós-analítica, 90-91  
   impacto nos resultados de exames  
     e nas condutas médicas, 86-88
- R**
- Receptor endotelial da proteína C, 374  
 Rh *ver* Sistema Rh  
 Rouleaux eritrocitário, 57-58
- S**
- Sarcoma mieloide, 297  
 Segmentados, 212-213  
 Septicemia, 251-252  
 Série branca, 58-61, 205-254  
   leitura de lâminas, 58-61  
     anomalias hereditárias dos  
       leucócitos, 59  
     corpúsculos de Döhle, 58-59  
     fragmentos de citoplasma  
       de células leucêmicas, 60  
     granulações tóxicas, 58  
     granulócitos hipogranulares  
       ou agranulares, 59-60  
     polilobócitos e hipossegmentação, 59  
     restos nucleares, 60  
     vacúolos citoplasmáticos, 58  
 leucograma, 205-254, 255-262  
   análise da medula óssea, 208-210  
   angiogênese, 205-208  
   anomalias leucocitárias, 260-262  
   apendicite, 245  
   artrite infecciosa, 245-246  
   artrite reumatoide, 246-247  
   basófilos, 214, 225  
   bastonetes, 212-213  
   disenteria amebiana, 247  
   disenteria bacilar, 247  
   endocardite, 247  
   eosinófilos, 214, 223-225  
   gastrenterite por salmonela, 247-248  
   infecção pulmonar, 248  
   infecção urinária, 248-249  
   leptospirose, 249  
   linfócitos, 214, 225-232, 255  
   lúpus eritematoso sistêmico, 249-250  
   malária, 250-251  
   meningite, 251  
   metamielócitos, 212-213  
   mieloblasto, 210-211  
   mielócito, 211-212  
   monócitos, 214-215, 221-223  
     e sistema fagocitário  
       mononuclear, 221-223  
   monocitose e monocitopenia, 243-245  
   morfologia das células  
     hematopoiéticas normais, 210-215  
   neutrofilia e neutropenia, 240-244



- neutrófilos, 215-221  
 dificuldades de interpretação, 217-221  
 pró-mielócito, 211  
 processo infeccioso bacteriano agudo, 235-240  
 processo inflamatório crônico, 240  
 processos amigdalianos, 245  
 processos infecciosos virais, 255-256  
 segmentados, 212-213  
 septicemia, 251-252  
 velocidade de hemossedimentação, 252-254
- Série vermelha, 51-58, 93-200  
 eritrograma, 93-200  
 anemias, 110-200  
 eritropoiese, 93-104  
 metabolismo energético do eritrócito, 104-108
- leitura de lâminas, 51-58  
 aglutinação eritrocitária, 57-58  
 anisocitose, 51-53  
 hipocromia, 55  
 inclusões eritrocitárias, 55  
 macrocitose, 51-53  
 microcitose, 51-53  
 poiquilocitose, 53-54, 55t  
 policromatofilia, 54-55  
*rouleaux* eritrocitário, 57-58
- Síndrome(s), 259-261, 285-293, 331-332, 364-369  
 antifosfolípideo (SAF), 364-369  
 da ausência de rádio, 331  
 de Bernard-Soulier, 331, 332f  
 de Chediak-Higashi, 260-261  
 de imunodeficiência adquirida, 259-260  
 de Wiskott-Aldrich, 331  
 mielodisplásicas/mielodisplasias (SMDs/MDs), 285-288  
 mielodisplásicas/neoplasias mieloproliferativas (SMDs/NMPs), 288-293  
 anemia refratária com sideroblastos em anel associada à intensa trombocitose (ARSA-T), 292-293  
 leucemia mieloide crônica atípica (LMCa), 291-292  
 leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), 288-291
- Sistema ABO, 393-397, 420-425  
 anticorpos, 394-395  
 antígenos, 393, 394t  
 discrepâncias, 395-397, 420, 422, 424-425  
 resolução de, 395-397
- ausência ou diminuição de antígenos, 395-396, 422  
 reações inesperadas com antissoros (prova direta), 396-397  
 reações inesperadas com eritrócitos A1 e B (prova reversa), 397  
 subgrupos fracos, 393-394  
 tipagem sanguínea, 395, 417
- Sistema fibrinolítico, 380-383  
 deficiências do, 382-383  
 hemorragia e trombose, 382-383  
 inibidores do, 381  
 plasminogênio, 380-381  
 ativador tecidual (t-PA), 381  
 ativador tipo uroquinase (u-PA), 381  
 regulação do, 381-382
- Sistema Rh, 397-402, 418  
 antígenos D variantes, 397-399  
 D fraco, 398  
 D parcial, 398-399  
 DEL, 399  
 antígenos Rh, 397  
 escolha do reagente, 399-400  
 resolução de discrepâncias, 401-402  
 controle de Rh positivo, 401-402  
 variantes de D, 402  
 Rhnull, 400-401  
 tipagem sanguínea, 401, 418
- Sistemas automatizados em hematologia, 17
- ## T
- Talassemias, 145-153  
 $\alpha$ -talassemias, 147-148  
 $\beta$ -talassemia, 148-150  
 diagnóstico diferencial, 151-152
- Tempo, 341, 383-387  
 de protrombina (TP), 383-385  
 de sangramento, 341  
 de trombina (TT), 387  
 de tromboplastina parcial ativada (TTPa), 385-387
- Teste da antiglobulina humana, 192-193, 404-407, 409-410  
 direto, 409-410  
 indireto, 404-407  
 em gestantes, 406-407  
 eritrócitos-controle de COOMBS, 405-406  
 eritrócitos reagentes, 404-405
- Teste de Coombs *ver* Teste da antiglobulina humana
- Tromboastenia de Glanzmann, 331-332
- Trombocitemia essencial (TE), 279
- Trombocitopenia(s), 336-337  
 causada por medicamentos, 336-337  
 por hiperesplenismo, 336
- Trombocitopoiese, 323-324
- Trombocitoses, 337-338
- Trombofilias, 372-376  
 antitrombina, 373-374  
 concentração elevada de fibrinogênio, 375  
 fator V de Leiden, 375  
 hiper-homocisteinemia, 374-375  
 inibidor da via do fator tissular, 374  
 mutações do gene da protrombina, 374  
 nível elevado de fator VIII, 375-376  
 proteína C, 372-373  
 proteína S, 373  
 receptor endotelial da proteína C, 374  
 trombomodulina, 374
- Trombomodulina, 374
- Trombopoietina (TPO), 324-325
- Tromborregulação, 320-321
- Trombose, 376-380, 382-383  
 controle da terapia antitrombótica, 378-380  
 embolia pulmonar, 378f
- Tubo(s) de coleta, 7-8  
 material do, 7-8  
 ordem na coleta, 7
- ## V
- Velocidade de hemossedimentação, 252-254
- Vitamina B<sub>12</sub>, 98-99, 173-174  
 deficiência de, 173-174  
 achados laboratoriais, 174-175  
 lactato desidrogenase, 175
- Vitamina K, deficiência de, 363
- von Willebrand, 353-354, 361-362  
 doença de, 361-362  
 fator de, 353-354
- ## Z
- Zimogênios, 347-351  
 fatores dependentes de vitamina K, 347-350  
 ciclo da vitamina K, 347-348  
 fator II, 348  
 fator VII, 349  
 fator IX, 349  
 fator X, 349-350  
 fatores não dependentes de vitamina K, 350-352  
 fator XI, 350  
 fator XII, 350-351  
 fator XIII, 351